



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO EM CÃES  
NA PRÁTICA CLÍNICA – ESTUDO RETROSPETIVO DE 130 CASOS

ADRIANA CARIA PEDRO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes  
Vitor Villa de Brito

Dr. Hugo Emanuel Almeida Lucas

ORIENTADOR

Dr. Hugo Emanuel Almeida Lucas

COORIENTADOR

Doutor José Manuel Chéu Limão Oliveira

2018

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO EM CÃES  
NA PRÁTICA CLÍNICA – ESTUDO RETROSPETIVO DE 130 CASOS

ADRIANA CARIA PEDRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes  
Vitor Villa de Brito

Dr. Hugo Emanuel Almeida Lucas

ORIENTADOR

Dr. Hugo Emanuel Almeida Lucas

COORIENTADOR

Doutor José Manuel Chéu Limão Oliveira

2018

LISBOA

---



“Confia no Senhor de todo o teu coração,  
e não te estribes no teu próprio entendimento”

Provérbios 3:5

## **Agradecimentos**

Antes de mais tenho de agradecer ao meu orientador, Dr. Hugo Lucas, pela simpatia, incentivo e disponibilidade constante em guiar a minha mente confusa. Um obrigado também ao meu co-orientador, Professor Doutor José Limão Oliveira, pelo imprescindível contributo para a realização desta dissertação.

Deixo um agradecimento ao Dr. Jorge Cid por me permitir a realização do estágio curricular no Hospital Veterinário do Restelo, e a todos os funcionários desta, que foi para mim como uma segunda casa. Em especial à Dra. Joana Sismeiro que contribuiu com o seu conhecimento, amabilidade e fotografias para este trabalho e à Dra. Sofia Zamith que comigo se aventurou noutros projetos. Aos restantes médicos, enfermeiros e auxiliares um grande obrigado pelos conhecimentos transmitidos e pela paciência com que o fizeram.

À casa mãe, a FMV, obrigada pelos 5 anos de aventuras e aprendizagem, porque o que fica são os bons momentos e as boas pessoas. Em especial ao professor Telmo pelas sessões de terapia e pela ajuda no tratamento estatístico dos dados, e aos padrinhos internacionais Catarina Gomes e Alexandre Conduto pela passagem geracional de informações.

Para a Dra. Joana e Dr. Francisco fica um agradecimento especial por terem sido o meu primeiro contacto com clínica e por me fazerem sempre sentir bem-vinda.

O maior dos obrigados vai para um grupo maravilhosos de miúdas que eu tenho o prazer de chamar amigas, à Sofia pela reunião na aula fantasma, à Claudia pelas aventuras no Porto, à Inês por não me cobrar as cavalitas, à Ester porque mais vale tarde que nunca, à Raquel pelos regionalismos e à Ana por ser a minha companheira filosófica, um enorme obrigado. Isto é para a vida...nem pensem que conseguem escapar!

E por último, mas no topo do pódio, as minhas raízes...a família, com quem eu aprendi a ser quem sou. À família de sangue e à da fé obrigado pela força, motivação, e por não pararem de acreditar em mim. Em particular à minha Mãe, obviamente a melhor do mundo, obrigada por te teres desdobrado em dois, obrigada pelo teu amor e obrigada por teres feito de motorista por dois anos, bem sei que te custou.

À minha irmã, agradeço em antecipado pela viagem que me deve! Barcelona ou não, tenho é de andar de avião.

Aos meus gatos Tigre e Nicolau e aos animais que já cá não estão, por terem sido voluntários à força e a minha inspiração.

A todos os que contribuíram para que chegasse até aqui, quer na construção do ser Humano que sou, quer na construção da Médica Veterinária que serei, um muito obrigado!

# ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO EM CÃES NA PRÁTICA CLÍNICA – ESTUDO RETROSPETIVO DE 130 CASOS

## Resumo

A análise de Líquido Cefalorraquidiano (LCR) é um exame complementar de diagnóstico extremamente útil, pois permite o acesso a informações relativas à saúde neurológica dos pacientes. Esta é frequentemente realizada com o propósito de auxiliar no processo diagnóstico ou para o controlo da evolução clínica dos doentes. Com o presente estudo procurou-se conhecer a realidade clínica associada a este exame, desde os sinais clínicos dos cães a que é colhido LCR, passando pelos resultados desta análise, até ao desfecho clínico dos episódios em estudo.

No presente estudo foram incluídos 130 cães, os seus LCR foram analisados, comparando-se os resultados obtidos nos exames citológicos e nos PCR realizados com o descrito na bibliografia. Foram ainda comparados os desfechos clínicos de 54 cães com diferentes resultados na avaliação citológica, procurando-se perceber se as conclusões extraídas da análise de LCR possuem valor como ferramenta de prognóstico.

A contagem de células nucleadas totais apresentou-se aumentada em 62 (47,7%) amostras, 55 (42,3%) com pleocitoses de células mistas e 7 (5,38%) neutrofílicas, tendo sido identificada a presença de bactérias numa amostra deste último grupo. Não foram identificadas pleocitoses mononucleares. Em 32 amostras foram realizadas técnica de PCR para deteção de agentes infecciosos, tendo sido, em 4 delas identificados os seguintes agentes: uma com *Toxoplasma gondii*, uma com *Neospora caninum* e duas com o vírus da esgana canina. A amostra com *Neospora caninum* não evidenciou qualquer alteração à citologia, enquanto que as restantes 3 amostras apresentaram pleocitoses moderadas de células mistas. Os cães de raça Beagle demonstraram uma associação com as pleocitoses neutrofílicas. A análise citológica e PCR de LCR demonstrou não possuir valor prognóstico.

Os dados obtidos reforçam a importância da análise do LCR em cães com doença neurológica, dada a frequência de pleocitoses e de agentes infecciosos no LCR neste estudo ter sido superior à descrita na bibliografia. Concluiu-se também que o recurso a técnicas moleculares é essencial, mesmo quando o LCR não apresenta as alterações analíticas esperadas, devendo os clínicos recorrer a estas técnicas sempre que suspeitem de qualquer agente infeccioso como causa de meningite, não necessitando de o justificar na presença de uma pleocitose, mas sim nos sinais clínicos e diagnósticos diferenciais para cada caso.

**Palavras-chave:** Líquido cefalorraquidiano, neurologia clínica, cães, pleocitose.

# CEREBROSPINAL FLUID ANALYSIS AND INTERPRETATION IN DOGS IN CLINICAL PRACTICE - RETROSPECTIVE STUDY OF 130 CASES

## Abstract

The analysis of cerebrospinal fluid (CSF) is an extremely useful complementary diagnostic exam, as it allows access to information regarding the patient's neurological health. This test is often performed for the purpose of assisting the diagnosis process or for controlling the clinical evolution of patients. The present study aimed to understand the clinical reality of this exam, including the clinical signs of the dogs from which the CSF was collected, the results of this analysis and the clinical outcome of the episodes under study.

For this study, 130 dogs were included on which the CSF was analyzed, comparing the results obtained in the cytological tests and in the PCR with those described in the bibliography. The clinical outcomes of 54 dogs with different results in the cytological evaluation were also compared, in an attempt to understand whether the conclusions drawn from the CSF analysis were valuable as a prognostic tool.

The total nucleated cell count was increased in 62 (47.7%) samples, 55 (42.3%) with mixed cell pleocytosis and 7 (5.38%) neutrophilic, with bacteria identified in a sample from last group. No mononuclear pleocytosis were identified. Infectious agents were identified in 4 of the 32 samples where the PCR technique was performed: one tested positive for *Toxoplasma gondii*, one for *Neospora caninum* and two for canine distemper virus. The sample with *Neospora caninum* showed no change in cytology, whilst the other 3 samples had moderate mixed cell pleocytosis. Beagle dogs showed an association with neutrophilic pleocytosis. CSF cytological and PCR analysis showed no prognostic value.

The data obtained reinforced the importance of testing the CSF of dogs with neurological disease, given that the frequency of pleocytosis and infectious agents present in the CSF in this study was superior to that described in the literature. It can also be concluded that the use of molecular techniques is essential, even when the CSF does not present the expected analytical changes. The clinicians should resort to these techniques whenever they suspect an infectious agent as the cause of meningitis, without the need to justify it in the presence of pleocytosis, but in the clinical signs and the differential diagnosis of each case.

**Key words:** Cerebrospinal fluid, clinical neurology, dogs, pleocytosis.



## Índice geral

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índice de Figuras .....	vii
Índice de tabelas.....	vii
Índice de gráficos.....	vii
Lista de abreviaturas e siglas.....	viii
I- Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio .....	1
II- Introdução .....	3
III - Revisão Bibliográfica .....	4
1. Embriologia do sistema ventricular .....	4
2. Neuroanatomia e neurohistologia .....	5
2.1. Meninges .....	5
2.2. Barreira hematoencefálica e sangue-LCR .....	6
3. Fisiologia do LCR .....	8
3.1. Função do LCR.....	8
3.2. Produção de LCR .....	9
3.3. Circulação.....	10
3.4. Absorção .....	11
4. Colheita de LCR .....	12
4.1. Indicações para a colheita de LCR .....	12
4.2. A Técnica.....	14
4.3. Punção cisternal .....	15
4.4. Contraindicações e complicações.....	17
5. Análise de LCR .....	19
5.1. Avaliação macroscópica .....	20
5.2. Análise quantitativa.....	21
5.2.1. Teor em proteína.....	21
5.2.2. Contagens celulares.....	22
5.3. Avaliação citológica .....	23
5.3.1. LCR normal .....	23
5.3.2. Alterações na análise do LCR .....	24
5.3.2.1. Contaminação com sangue .....	24
5.3.2.2. Alterações na concentração proteica. Dissociação citoalbuminénica ....	25
5.3.2.3. Alterações na percentagem de leucócitos sem pleocitose .....	27
5.3.2.4. Aumento da contagem de células nucleadas .....	27

5.3.2.4.1. Pleocitose mononuclear .....	28
5.3.2.4.2. Pleocitose neutrofílica .....	29
5.3.2.4.3. Pleocitose eosinofílica.....	30
5.3.2.4.4. Pleocitose mista.....	31
5.3.2.5. Outras alterações .....	32
5.4. Técnicas moleculares.....	32
5.5. Outros Testes.....	34
IV– Análise e interpretação de líquido cefalorraquidiano em cães na prática clínica – estudo retrospectivo de 130 casos.....	37
1. Objetivos.....	37
2. Material e métodos .....	37
2.1. População em estudo.....	37
2.2. Critérios de exclusão .....	38
2.3. Protocolo e recolha de dados .....	38
2.4. Sinais clínicos.....	39
2.5. Colheita de LCR .....	40
2.6. Análise laboratorial.....	40
2.7. Métodos moleculares .....	42
2.8. Análise estatística dos dados .....	43
3. Resultados.....	43
3.1. Caraterização da amostra .....	43
3.3. Variáveis laboratoriais .....	46
3.3.1. Avaliação Macroscópica .....	46
3.3.2. Análise Quantitativa .....	46
3.3.3. Avaliação Citológica.....	47
3.4. Perfis Neurológicos .....	48
3.5. Desfecho do episódio clínico .....	49
3.6. Associação entre variáveis .....	51
3.6.1. A análise de LCR como ferramenta de prognóstico .....	51
3.6.2. Raças e Pleocitoses .....	53
4. Discussão .....	53
4.1. Critérios de exclusão e inclusão .....	53
4.2. Caracterização da amostra.....	54
4.3. Análise do LCR .....	56
4.4. Técnicas moleculares.....	59
4.5. Desfechos clínicos e a análise de LCR como preditor de desfechos clínicos ....	62
4.6. Raças e pleocitoses .....	64
5. Conclusões e perspectivas futuras .....	64

Bibliografia.....	67
Anexos .....	76
Anexo I - Características citológicas, considerações especiais ou diagnósticos diferenciais e comentários (extraído e traduzido de De Lorenzi & Mandara, 2016). ....	76
Anexo II – Diagnósticos diferenciais com base na contagem total de células nucleadas (extraído e traduzido de Wood et al, 2012).....	79

## Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do sistema ventricular do encéfalo do cão, vista lateral, dorsoventral (adaptado de De Lahunta, Glass e Kent, 2015).....	5
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura das meninges (adaptado de Wamsley, 2014).....	6
Figura 3 – Representação dos pontos de referência anatômicos e determinação do local de inserção da agulha para a colheita de LCR a partir da cisterna magna no cão, vista lateral, dorsoventral e aproximada. A - protuberância occipital externa, B – asa do atlas (Adaptado de Dewey <i>et al.</i> , 2016).....	16
Figura 4 - Pleocitose neutrofílica, coloração diff-quick (fotografia gentilmente cedida por Dra. Joana Sismeiro).....	29
Figura 5 - Sistema de sedimentação e os seus componentes. (1) lâmina, (2) seringa de insulina cortada, (3) molas de papel sem os respetivos arames de baixo (fotografia original).....	41

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Escalas de interpretação da proteína das tiras de análise de urina (fonte: Marcos & Santos, 2011).....	21
Tabela 2 – Sumário dos componentes avaliadas nas análises de rotina de LCR e intervalos de referência: (extraído de Diterlizzi, e Platt, 2009).....	24
Tabela 3 - Possíveis Causas de Dissociação Citoalbuminémica (adaptado de Wood <i>et al.</i> , 2012).....	26
Tabela 4- Limites de cada grau de pleocitose consoante diferentes autores.....	28
Tabela 5 - Sinais clínicos avaliados.....	39
Tabela 6 - Frequências absolutas e relativas dos sinais clínicos dos cães da amostra.....	45
Tabela 7 - Relação entre desfechos clínicos e resultados da análise do LCR.....	52
Tabela 8 - Relação entre desfechos clínicos e resultados do PCR do LCR.....	52
Tabela 9 - Distribuição de cães Beagle e não Beagle pelas citologias de LCR.....	53

## Índice de gráficos

Gráfico 1 - Frequências absolutas e relativas das raças presentes na amostra.....	44
Gráfico 2 - Distribuição das idades dos cães da amostra.....	44
Gráfico 3 - Frequências relativas dos resultados da análise citológica dos LCR.....	47
Gráfico 4 - Frequências relativas dos resultados do PCR.....	48
Gráfico 5 - Distribuição dos perfis neurológicos pelos resultados citológicos.....	49
Gráfico 6 - Distribuição dos desfechos clínicos em cães com alterações no LCR.....	50
Gráfico 7 - Distribuição dos desfechos clínicos nos cães sem alterações no LCR.....	51

## Lista de abreviaturas e siglas

µl – microlitro

ADN - ácido desoxirribonucleico

ARN - ácido ribonucleico

ATP - trifosfato de adenosina

BHE- barreira hematoencefálica

C1 - atlas

C2 - áxis

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

DI – decilitro

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*

Ex- exemplo

H<sup>+</sup> - iões hidrogénio

H<sub>2</sub>O – água

HCO<sub>3</sub> - bicarbonato

HD - hérnia discal

HVR - Hospital Veterinário do Restelo

Ig – imunoglobulinas

Kg - quilograma

LCR- líquido cefalorraquidiano

LEN - leucoencefalite necrotizante

LIT – líquido intersticial

MARE – meningite-arterite responsiva a esteroides

MEG – meningoencefalite granulomatosa

MEN – meningoencefalite necrotizante

Mg – miligrama

MI – mililitro

Mm - milímetro

MMPs - matrizes metaloproteinases

Na<sup>+</sup>- ião sódio

nPCR - nested reação de polimerase em cadeia

PCR – reação de polimerase em cadeia

PIC - pressão intracraniana

POE - protuberância occipital externa

QA - coeficiente de albumina

qPCR - reação de polimerase em cadeia em tempo real

RT-PCR - transcriptase reversa da reação de polimerase em cadeia

SNC - sistema nervoso central



## **I- Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio**

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi realizado no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), na área de clínica e cirurgia de animais de companhia, sob a orientação do Dr. Diogo Magno (médico veterinário responsável por todos os estagiários) e do Dr. Hugo Lucas (médico veterinário do serviço de Medicina Interna e Neurologia, orientador da dissertação de mestrado da aluna). Este teve uma duração de 6 meses, tendo tido início a 19 de setembro de 2016 e término a 19 de março de 2017, com um total de 1040 horas realizadas.

As atividades foram desenvolvidas ao longo de turnos diurnos de 8 horas e noturnos de 16 horas, em diferentes áreas de medicina de animais de companhia, consoante o escalonado quinzenal atribuído aos estagiários do HVR, que posteriormente escolhiam um médico dessa área para acompanhar. Deste modo houve oportunidade de acompanhar vários médicos veterinários de diferentes áreas, possibilitando um aumento do espectro de conhecimento e uma exposição a diferentes metodologias de trabalho, inclusive com a possibilidade de frequentar as áreas de preferência por períodos de um ou mais meses, nomeadamente medicina interna, cirurgia, neurologia e cardiologia.

Uma vez que o HVR é um Hospital de referência, para além de medicina interna, imagiologia, internamento e cirurgia, foi possível o acompanhamento e participação em casos de cardiologia, comportamento, dermatologia, novos animais de companhia, neurologia, oftalmologia, oncologia e ortopedia, bem como a participação pontual no serviço de laboratório e análises clínicas e em domicílios.

A realização de diversas ações médicas sob a supervisão do médico veterinário ou enfermeiro do respetivo serviço durante o período de estágio permitiu a aquisição e/ou aperfeiçoamento de competências como a preparação de fármacos e a sua administração pelas diferentes vias, colheita de sangue, colocação de cateteres endovenosos e sistema de venóclise, medição de glicemia e pressão arterial, limpeza de feridas e execução de pensos, algaliação de machos (cães), auxílio durante a drenagem de derrames (pericárdico, pleural e abdominal), realização de punção aspirativa por agulha fina ecoguiada, colheita de amostras para citologia e sua observação ao microscópio ótico, realização e interpretação de análises clínicas (bioquímicas, hemograma e microhematócritos), esfregaços de sangue e sua observação ao microscópio ótico, testes rápidos, preparação de amostras para envio para laboratórios externos, uso do refratómetro, urianálises, sementeira de culturas bacterianas, realização e interpretação de eletrocardiograma, exame oftalmológico e manipulação e contenção dos pacientes. Foi ainda possível a observação de recolha de líquido cefalorraquidiano e treino da técnica em cadáveres.

O acompanhamento de consultas das diferentes áreas assim como, o tempo decorrido no internamento, possibilitou contactar com os proprietários dos animais, recolher a anamnese e

fazer o exame de estado geral. Foi ainda possível realizar a contenção e posicionamento de animais durante as consultas, as ecografias e radiografias, tal como a manipulação do aparelho de raios-X, a realização de uma ecografia abdominal, a participação na realização de ecocardiografias, ecografia ocular, eletrorretinografia, tomografias computadorizadas e de endoscopias gastrintestinais para realização de biópsias ou remoção de corpos estranhos, complementada com a interpretação e discussão dos resultados obtidos nestes exames.

As consultas acompanhadas foram de índole variável, desde: primeira consulta, vacinação e desparasitação, diagnósticos e reavaliações, altas, controlo do paciente geriátrico, consultas de controlo pré-anestésico, referências e ainda urgências. Nos turnos noturnos as atividades desenvolvidas consistiram essencialmente em consultas de urgência, colaboração em cirurgias de urgência, monitorização e tratamento dos animais internados.

Relativamente às cirurgias, colaborou-se na preparação e administração de pré-medicação e indução anestésica, intubação endotraqueal, preparação do paciente, monitorização anestésica e seu acompanhamento durante o recobro. Foi ainda possível assistir a uma craniotomia e participar em diversas outras cirurgias, nomeadamente: trepanação da bula timpânica e remoção de pólipos do canal auditivo, resolução de colapso de traqueia, laqueação do ducto arterioso persistente, esplenectomias, resolução de torção gástrica, gastro e/ou enterotomia para remoção de corpo estranho, gastropexia, colecistoduodenostomia, biópsias digestivas, hepáticas e ganglionares, colocação de tubo esofágico, colocação de tubo de drenagem pleural, colocação de bypass uretral subcutâneo, ovariectomias eletivas e por piómetras (cadela, gatas e coelha), orquiectomia inguinal, remoção de mastocitoma da parede abdominal, correção de hiperplasia gengival, extrações dentárias e destartarizações, amputação de dígitos, ressecção da cabeça do fémur, artrodese pancarpal direita, ventral slot, hemilaminectomia, criocirurgia palpebral superior, cirurgia de catarata por facoemulsificação e endoscopias gastrintestinais com realização de biópsias e remoção de corpos estranhos.

Ao longo do estágio houve ainda a possibilidade de assistir a várias formações efetuadas tanto por pessoal externo ao hospital (vacinação - Letifend® e nutrição de animais de companhia), como por médicos do HVR, sobre os temas: displasia da anca e sinfiodese, eletrocardiograma, emergências, exame neurológico, exame oftalmológico, fluidoterapia, gestão e orientação clínica em consulta, insuficiência renal, monitorização anestésica, oncologia e vacinação. Tendo ainda apresentado um caso clínico aos colegas estagiários e assistido a apresentações palestradas por estes. A escolha do tema de tese “Análise e interpretação de líquido cefalorraquidiano em cães na prática clínica – estudo retrospectivo de 130 casos” é justificada pelo interesse da aluna em neurologia, pelo desafio que esta área representa para a mesma e, pela elevada frequência de recolha e análise deste líquido no HVR. O estágio desempenhou um papel fulcral na conquista de diversas competências para a aluna, quer a nível técnico-científico como a nível social.



## II- Introdução

Os casos de neurologia, podem ser extremamente desafiantes, frustrantes ou até mesmo assustadores (Nind, 2010; Platt & Olby, 2014). Isto, apesar deste campo se ter expandido substancialmente nas últimas duas décadas, devido não só ao aumento da dispersão de conhecimento, possibilitada pelos meios eletrónicos, mas também devido à disponibilidade de exames complementares de imagem e à maior exigência dos tutores em terapêuticas face a um prognóstico desconhecido (Platt & Garosi, 2012). Como tal, é desejável obter-se o máximo de informação sobre a saúde neurológica dos pacientes. Um dos exames que possibilita um acesso a uma larga gama de informações a este nível é a análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) (DiTerlizzi, 2006; Vernau, Vernau & Bailey, 2008).

No interior do sistema ventricular, dentro do encéfalo, no canal central da medula espinhal e no espaço subaracnoídeo, circula um líquido, o líquido cefalorraquidiano. Este líquido, por se encontrar em contacto direto com o sistema nervoso, pode apresentar alterações nas suas características físicas e na sua composição quando este mesmo sistema sofre alterações patológicas (Molina, 2015).

Como tal, a análise deste líquido é frequentemente realizada com o propósito de se chegar a um diagnóstico ou para se conhecer a gravidade e a natureza de doenças que envolvem o sistema nervoso central (SNC) (Kulkarni, 2009). Apesar da análise de LCR ser o exame de diagnóstico ante-mortem mais fiável para a identificação de inflamação no SNC e de possuir uma sensibilidade razoável para a deteção de doenças, podendo em alguns casos fornecer o diagnóstico final, esta análise só ocasionalmente sugere um diagnóstico específico, sendo utilizada maioritariamente como auxílio ao processo de diagnóstico, excluindo a probabilidade de certos processos de doença estarem presentes. (Vernau *et al.*, 2008; Platt & Freeman, 2014; Coates & O'Brien, 2017). Tal ocorre porque as alterações possíveis de se encontrar no LCR são relativamente limitadas face à variedade de doenças neurológicas existentes, sendo este exame mais útil quando se correlacionam os resultados com a história pregressa, com os achados clínicos e outros exames complementares, tanto de imagem como laboratoriais (Vernau *et al.*, 2008).

Serão abordados os aspetos funcionais do LCR, da sua colheita, análise e interpretação. Procurando-se essencialmente conhecer a realidade clínica associada a este exame, desde os sinais clínicos observados que motivam os clínicos a optar por este exame, os resultados desta análise e seu significado e ainda o desfecho clínico dos episódios em estudo.

### III - Revisão Bibliográfica

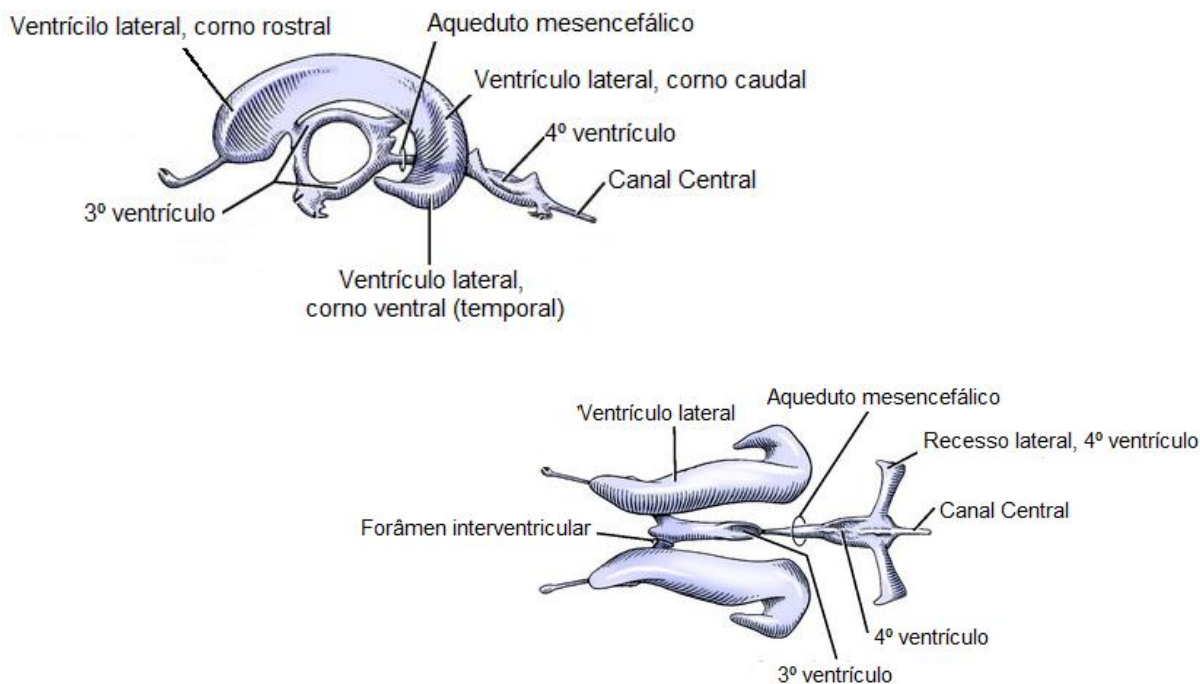
#### 1. Embriologia do sistema ventricular

O sistema nervoso central tem a sua origem embrionária no tubo neural, com o lúmen deste a originar os ventrículos do cérebro e o canal central da medula espinhal (Konig, Liebich & Creveny, 2004; McGeady, Quinn, Fitzpatrick, Ryan & Kilroy, 2017). Durante o desenvolvimento embrionário a extremidade cefálica do tubo neural expande-se em 3 dilatações que constituem as vesículas encefálicas primárias, o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo. Estas irão dar origem aos vários componentes do encéfalo, incluindo os ventrículos e os canais que os interligam, constituindo assim o sistema ventricular. As vesículas encefálicas primárias posteriormente dividem-se noutras 5 vesículas, com o prosencéfalo a dar origem ao diencéfalo e telencéfalo e, o rombencéfalo ao metencéfalo e mielencéfalo (Sinowatz, 2010; Sadler, 2016;).

A vesícula encefálica mais rostral, o telencéfalo, consiste em 2 evaginações laterais, que dão origem aos hemisférios cerebrais e, as suas cavidades, aos ventrículos laterais esquerdo e direito. O 3º ventrículo envolve a aderência intertalâmica do diencéfalo, sendo formado pela cavidade do diencéfalo e pela extremidade rostral do telencéfalo que forma a parede rostral deste ventrículo ao nível da linha média, denominando-se esta parede por lâmina terminalis. O 3º ventrículo comunica com os ventrículos laterais através do forâmen interventricular, denominado também de forâmen interventricular de Monro (Figura 1). O rombencéfalo dá origem ao 4º ventrículo, com o mielencéfalo a constituir a maior parte deste ventrículo e o metencéfalo a sua porção mais rostral. O lúmen central do mesencéfalo permanece estreito formando o aqueduto mesencefálico que liga o 3º e o 4º ventrículos, sendo este aqueduto também designado por aqueduto de Sylvius. O 4º ventrículo comunica ainda com o espaço subaracnoideu através de duas aberturas laterais que se desenvolvem no teto deste (Fletcher, 2013; Sadler, 2016; McGeady *et al.*, 2017).

A partir da camada neuroepiial desenvolve-se a camada de epitélio endotelial que reveste os ventrículos e os canais que os interligam (Konig *et al.*, 2004; Sinowatz, 2010). Em algumas zonas ao longo do chão de cada ventrículo lateral e do teto do 3º e 4º ventrículo, esta camada de células endoteliais recobre vasos da pia-máter, formando a tela coroideia. As projeções de tela coroideia para dentro das cavidades ventriculares formam estruturas vilosas, originando o plexo coroide (Gil, n.d.; Fletcher, 2006; Wolburg & Paulus, 2010; McGeady *et al.*, 2017).

Figura 1 – Representação esquemática do sistema ventricular do encéfalo do cão, vista lateral e dorsoventral (adaptado de De Lahunta, Glass e Kent, 2015).



## 2. Neuroanatomia e neurohistologia

### 2.1. Meninges

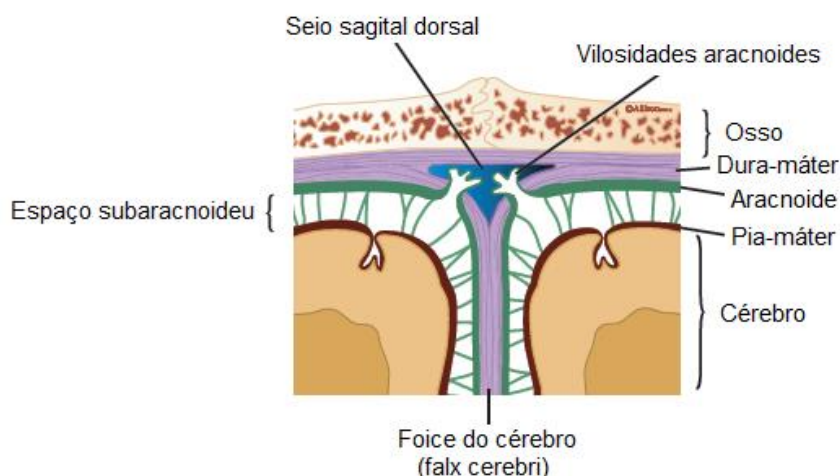
A cobrir o SNC e as raízes dos nervos cranianos e espinhais encontram-se três camadas de tecido conjuntivo denominadas de meninges: a dura-máter, a aracnoide e a pia-máter, enumeradas de fora para dentro (Figura 2) (Junqueira & Carneiro, 2008; Fletcher, 2013).

A camada mais externa, a dura-máter, consiste numa camada exterior fixa ao perióstio e numa mais interna que projeta extensões que separam algumas zonas do encéfalo (Gil, n.d.). Esta camada é a mais espessa e prolonga-se para além da cavidade craniana para porções das duas primeiras vértebras cervicais. A partir destas vértebras encontra-se o espaço epidural que separa a dura-máter do osso (De Lahunta *et al.*, 2015).

Aderente à dura-máter por via de desmossomas, encontra-se a fina membrana aracnoide (De Lahunta *et al.*, 2015). Esta, para além da componente membranar que contacta com a dura-máter, possui trabéculas aracnoides que a ligam à pia-máter através do espaço subaracnoideu, espaço que as duas membranas delimitam (Junqueira & Carneiro, 2008). O espaço subaracnoideu comunica com os ventrículos cerebrais e contém no seu interior para além das trabéculas, LCR, vasos sanguíneos e raízes de nervos espinhais (Gil, n.d.; Junqueira & Carneiro, 2008). Em certas áreas do espaço subaracnoideu, existem zonas dilatadas, as cisternas. Uma das maiores é a cisterna cerebelomedular ou cisterna magna, localizada entre o cerebelo e a medula oblongata (Gil, n.d.).

A membrana mais interna é a pia-máter, uma membrana fina muito vascularizada e aderente ao tecido nervoso. Esta reveste ainda os espaços perivasculares dos vasos que penetram no tecido nervoso (Junqueira & Carneiro, 2008). A dura-máter, por ser espessa, é também conhecida como paquimeninge e as mais finas aracnoide e pia-máter, como leptomeninge (Thomson, Hahn & Johnson, 2012).

Figura 2 – Estrutura das meninges (adaptado de Wamsley, 2014).



## 2.2. Barreira hematoencefálica e sangue-LCR

Para além das meninges, o SNC (cérebro e medula espinhal) possui outras barreiras. Estas, têm a função de separar o tecido nervoso dos fluidos sistémicos (Di Terlizzi & Platt, 2006). Existindo três líquidos extracelulares associados ao parênquima cerebral, nomeadamente, o sangue, o líquido intersticial cerebral (LIT) e o LCR, estas barreiras possuem características morfológicas e fisiológicas que lhes permitem separar estes líquidos (De Lahunta *et al.*, 2015). Apesar de todos os nutrientes essenciais chegarem ao cérebro via sangue ou LCR e, apesar de serem necessárias trocas entre os vários fluidos para a manutenção do normal funcionamento cerebral (De Lahunta *et al.*, 2015; Reece, Erickson, Goff, & Uemura, 2015), é de notar que a concentração de diversas substâncias no LCR difere da existente no fluido extracelular do restante organismo, para além de algumas moléculas saírem com dificuldade do sangue para o LCR apesar da facilidade com que passam para o LIT do resto do corpo (Hall, 2016). Tal ocorre devido à existência destas estruturas que funcionam como barreira ao interior do cérebro, a barreira sangue-LCR e a barreira hematoencefálica, tendo as células que as constituem controlo sobre a composição destes líquidos cerebrais (Di Terlizzi & Platt, 2006; Reece *et al.*, 2015; Hall, 2016).

A barreira que separa o sangue do LIT, ou seja, que separa o sangue do cérebro/medula espinhal, encontra-se ao nível dos capilares do tecido nervoso, denominando-se de barreira

hematoencefálica (BHE) (Di Terlizzi & Platt, 2006; De Lahunta *et al.*, 2015; Furr, 2015; Reece *et al.*, 2015; Hall, 2016). Esta barreira existe devido à reduzida permeabilidade dos capilares sanguíneos, causada pelas junções oclusivas existentes entre as células endoteliais não fenestradas destes capilares, que as une fortemente (Konig *et al.*, 2004; Junqueira & Carneiro, 2008; Hall, 2016). Para além das células endoteliais, fazem também parte desta barreira a membrana basal que rodeia estas células, os prolongamentos dos astrócitos que se encontram na superfície desta membrana e as restantes células que rodeiam os capilares (Konig *et al.*, 2004; Junqueira & Carneiro, 2008; De Lahunta *et al.*, 2015; Furr, 2015). O transporte ativo que ocorre nesta barreira determina a composição do LIT (Furr, 2015).

A barreira sangue-LCR separa, como o nome indica, o sangue da circulação sistémica do LCR (Reece *et al.*, 2015; Furr, 2015; Hall, 2016). Esta função é desempenhada pelo plexo coroide que consiste numa camada de duas células e a membrana basal que as separa. A camada de células do endotélio capilar possuem muitas fenestrações e são desprovidas de junções oclusivas, já as células cuboides do epitélio coroide possuem, na sua superfície ventricular, estas ligações entre si, o que as une fortemente (Di Terlizzi & Platt, 2006; De Lahunta *et al.*, 2015; Reece *et al.*, 2015). A presença das junções oclusivas nas células do epitélio coroide permite o controlo das substâncias que passam através desta membrana, impedindo, por exemplo, a passagem de moléculas hidrossolúveis e macromoléculas (Di Terlizzi & Platt, 2006; Reece *et al.*, 2015). Deste modo, tal como a BHE é fundamental para o controlo da composição do LIT, também a barreira sangue-LCR o é para o LCR (Furr, 2015; Reece *et al.*, 2015).

Os ventrículos e o espaço subaracnoideu não possuem barreiras significativas a separar o LCR do líquido extracelular dos espaços intersticiais cerebrais, ou seja, do LIT, tornando estes líquidos contínuos, uma vez que o LCR comunica com o LIT e as substâncias que entram para este podem passar para o LIT, e vice-versa (Di Terlizzi & Platt, 2006; De Lahunta *et al.*, 2015).

Quando a BHE não se encontra íntegra, o que ocorre nas condições inflamatórias, dá-se a passagem de substâncias tóxicas do sangue para o cérebro (Di Terlizzi & Platt, 2006). Uma vez que o LCR é contínuo com o LIT e envolve o SNC, em casos de doença cerebral ou da medula espinhal, a composição do LCR pode-se encontrar alterada, pelo que se pode concluir que a produção e composição do LCR também depende do normal funcionamento da BHE, podendo, por esta razão, a sua análise ser utilizada como ferramenta de diagnóstico (Furr, 2015).

Quando saudável, a reduzida permeabilidade destas barreiras previne a entrada de diversas substâncias no SNC, impedindo frequentemente diversos princípios ativos de atingir níveis terapêuticos no parênquima cerebral e no LCR, como é o caso de substâncias não lipossolúveis, como a penicilina (De Lahunta *et al.*, 2015; Hall, 2016). Para além da solubilidade lipídica, o tamanho molecular e a capacidade de ligação a proteínas também

influencia a passagem das moléculas através da BHE. É de salientar que para além destas dificuldades, o plexo coroide remove ativamente os fármacos do LCR (Mankin, 2017).

### 3. Fisiologia do LCR

#### 3.1. Função do LCR

O LCR tem várias funções, uma das mais importantes consiste em proteger fisicamente o cérebro e a medula espinhal de situações traumáticas. Estas estruturas estão como que suspensas neste líquido, pelo que, aquando de uma situação traumática a nível do crânio e/ou canal raquidiano, a força desta é disseminada pelo LCR e não transmitida diretamente ao tecido cerebral (Cook & DeNicola, 1988; Klein, 2014; McGeadyT *et al.*, 2017). Outra função do LCR passa por ajudar a proteger o SNC das mudanças de pressão intracraniana (PIC). Em conjunto com o fluxo cerebral sanguíneo, o LCR é responsável pela modulação e regulação da PIC, garantindo também uma correta perfusão dos tecidos cerebrais (reflexo de cushing<sup>1</sup>). Segundo a doutrina de Monro-Kellie o crânio é uma estrutura rígida e inextensível, logo o volume que comporta mantém-se constante independentemente do seu conteúdo. Os componentes normalmente encerrados na cavidade craniana são o parênquima cerebral, o LCR e o sangue, pelo que quando um dos três componentes aumenta ou aparece um quarto componente (por ex.: um tumor), apenas o sangue e o LCR se podem deslocar de modo a prevenir um aumento PIC e consequentes lesões nos tecidos nervosos. O espaço subaracnoideu cervical tem a capacidade de acumular momentaneamente LCR devido à elasticidade da dura-máter. Assim em casos de aumento abrupto do volume intracraniano, é para aqui que o LCR se desloca (Turner, 2000; Di Terlizzi & Platt, 2006; Rodríguez-Boto, Rivero-Garvía, Gutiérrez-González & Márquez-Rivas, 2015).

Os neurónios são muito menos tolerantes a alterações no ambiente extracelular que os rodeiam do que outras células, necessitando de uma composição iónica estável. A proximidade do LCR com o parênquima cerebral e o seu equilíbrio com o líquido extracelular que se encontra nos espaços intersticiais, permite a manutenção de um microambiente quimicamente mais estável e controlado para as células do sistema nervoso (Cook & DeNicola, 1988; Di Terlizzi & Platt, 2006; Klein, 2014). Tal só é conseguido pela composição iónica estritamente controlada do LCR que, devido à sua substituição múltipla diária, participa no processo de excreção de metabolitos celulares potencialmente tóxicos. Uma vez que o cérebro não tem sistema linfático, a excreção destas substâncias é feita via espaços perivasculares e difusão direta para o espaço subaracnoideu, através da pia-máter, sendo

---

<sup>1</sup> Reflexo de Cushing é uma resposta isquémica do SNC, que consiste na elevação da pressão arterial em resposta a uma falta de suprimento sanguíneo cerebral, causada pela compressão do parênquima cerebral e suas artérias, que por sua vez se deve a um aumento da pressão do LCR igualando a pressão arterial. Quando a pressão arterial aumenta para um nível superior ao da pressão do LCR, o sangue flui novamente para os vasos do cérebro aliviando a isquemia cerebral (Hall, 2016).

posteriormente transportadas pelo LCR e removidas nas vilosidades aracnoides para as veias cerebrais - locais de absorção do LCR (Di Terlizzi & Platt, 2006; Klein, 2014; De Lahunta et al., 2015).

A capacidade de transporte do LCR permite-lhe ser uma fonte de nutrição para o cérebro por transportar nutrientes entre o sangue e o parênquima cerebral. Esta capacidade permite-lhe ainda ser um sistema de distribuição cerebral de substâncias biologicamente ativas, isto é, neurotransmissores e neuropéptidos, como por exemplo hormonas polipeptídicas, fatores de crescimento, etc. (Di Terlizzi & Platt, 2006; Klein, 2014; De Lahunta *et al.*, 2015).

### **3.2. Produção de LCR**

O LCR é maioritariamente produzido no plexo coroide do sistema ventricular do cérebro segundo um gradiente iónico nas células epiteliais coroideias (Cook & DeNicola, 1988; Uemura, 2015).

Dependendo do gradiente de pressão, o plasma é filtrado passivamente dos capilares do plexo coroide para o interstício deste. Posteriormente, por transporte ativo, as moléculas e iões são transportados do interstício para o lúmen ventricular (Sakka, Coll & Chazal, 2011). O transporte ativo realiza-se através do epitélio coroide com a intervenção de proteínas de transporte membranar e canais seletivos, regulando assim a passagem de iões e moléculas através desta barreira de células, o que permite um controlo eficaz da composição do LCR (Klein, 2014).

A enzima anidrase carbónica, que se encontra no citoplasma das células epiteliais, catalisa a reação da água e do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) produzido pelo metabolismo celular, na formação de iões hidrogénio ( $\text{H}^+$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Di Terlizzi & Platt, 2006; Sakka *et al.*, 2011; Uemura, 2015). Na superfície basal das células coroides, proteínas transmembranares trocam o  $\text{H}^+$  formado, por iões de sódio ( $\text{Na}^+$ ) do sangue. Posteriormente, este  $\text{Na}^+$  é bombeado para o lúmen ventricular através de bombas dependentes de ATP localizadas na membrana apical das células coroides. Juntamente com o  $\text{Na}^+$ , é bombeado para os ventrículos cloro e  $\text{HCO}_3^-$  de forma a neutralizar o excesso de carga positiva que lá existe, provocado pelo  $\text{Na}^+$  (Sakka *et al.*, 2011; Uemura, 2015). O transporte destes iões provoca um gradiente osmótico que regula o conteúdo aquoso do LCR, uma vez que a água difunde-se para os ventrículos passivamente de forma a manter o equilíbrio osmótico (Klein, 2014).

Ao contrário dos nutrientes que o SNC recebe via fluido intersticial, os micronutrientes são entregues maioritariamente via LCR. Deste modo os micronutrientes são transportados segundo um sistema de difusão facilitada, por proteínas transmembranares da superfície basal das células epiteliais coroideias, para dentro destas, sendo concentradas no seu citoplasma. Posteriormente são libertados para os ventrículos através da superfície apical das mesmas células epiteliais coroideias (Uemura, 2015).

Para além do plexo coroide existem outros locais onde uma pequena quantidade de LCR é produzida, nomeadamente os capilares da leptomeninge que se encontram no espaço subaracnoideu, as células ependimárias que revestem os ventrículos e os vasos sanguíneos do parênquima cerebral e medular (Gil, n.d.; De Lahunta *et al.*, 2015; Furr, 2015; Dewey, Costa e Ducoté, 2016; Hall, 2016). Estudos experimentais demonstraram que 35% do LCR provém dos ventrículos laterais e do 3º ventrículo, 23% do 4º ventrículo e 42% do espaço subaracnoideu (Di Terlizzi & Platt, 2006; De Lahunta *et al.*, 2015).

Em cães, o LCR é produzido a uma taxa quase constante de aproximadamente 0.047ml/min, variando com o tamanho do animal e com o método de determinação utilizado. Ou seja, o LCR é produzido a uma taxa bastante rápida, sendo o volume total de LCR produzido e absorvido 3 a 5 vezes por dia. A taxa de produção é independente das variações de pressão do LCR no sistema ventricular e da pressão hidrostática do sangue, mas está relacionada com a pressão osmótica deste último, com as trocas iónicas de Na<sup>+</sup> e HCO<sub>3</sub> e com a estimulação adrenérgica. Assim, se houver um aumento da PIC ou da do LCR, devido por exemplo, a uma obstrução ao fluxo ou por presença de uma massa intracraniana, continua a haver produção de LCR. No entanto, caso seja administrada uma solução salina hipertónica ou manitol, um diurético osmótico, a sua taxa de formação diminui (Kerwin *et al.*, 2009; Di Terlizzi & Platt, 2006; Klein, 2014; Furr, 2015; De Lahunta *et al.*, 2015).

### 3.3. Circulação

O LCR encontra-se não só nos ventrículos cerebrais, mas também nas cisternas cerebrais (ex: cisterna magna), no espaço subaracnoideu que rodeia o cérebro e a medula espinhal e ocupa ainda os espaços perivasculares cerebrais bem como o canal central da medula espinhal (Junqueira & Carneiro, 2008; Hall, 2016).

Após ser produzido, o LCR flui numa direcção caudal através do sistema ventricular e do canal central da medula espinhal em direcção à cauda equina. Flui também pelo espaço subaracnoideu até alcançar o sistema venoso onde é absorvido (Klein, 2014; Wamsley, 2014; De Lahunta *et al.*, 2015; Uemura, 2015).

O LCR produzido no plexo coroide dos ventrículos laterais, junta-se ao produzido no 3º ventrículo fluindo até este através dos forâmenes de Monro. Posteriormente passa pelo aqueduto de Sylvius para entrar no 4º ventrículo. A passagem do LCR deste último ventrículo para o espaço subaracnoideu é feita através das suas duas aberturas laterais (Cook & DeNicola, 1988; Turner, 2000; Klein, 2014; Hahn & Mast, 2015). Ao deixar o 4º ventrículo o LCR entra também no canal central da medula espinhal (Uemura, 2015).

No espaço subaracnoideu, o LCR circula sobre o cerebelo, ventral ao Tentório e posteriormente sobre o cérebro, onde passa para o seio sagital dorsal e outros seios venosos cerebrais através das vilosidades aracnoides, que consistem em dilatações fechadas de



aracnoide que se projetam, perfurando a dura-máter, fazendo saliência nos seios venosos (Junqueira & Carneiro, 2008; De Lahunta *et al.*, 2015; Uemura, 2015; Hall, 2016).

Os espaços perivasculares, espaços entre os vasos sanguíneos e o parênquima cerebral ou medular, permitem a passagem de LCR do espaço subaracnoideu para o cérebro ou medula espinhal (Brodbelt & Stoodley, 2010). Sendo estes espaços extensões do espaço subaracnoideu e havendo uma continuidade entre a pia-máter e a adventícia dos vasos sanguíneos, parecem ser fenestrações nos vasos da pia-máter que permitem o acesso do LCR a espaços intersticiais muito pequenos do parênquima cerebral (Welch, Caplan, Reis, Siesjo & Weir, 1997; De Lahunta *et al.*, 2015). O fluxo de entrada do LCR no parênquima cerebral ao longo das artérias penetrantes é devido às pulsações das próprias artérias ou ao gradiente de pressão hidrostática entre os diferentes compartimentos que contêm este líquido (Welch *et al.*, 1997; Brodbelt & Stoodley, 2010). É de salientar que estes espaços facilitam as trocas entre o LCR e o LIT (Welch *et al.*, 1997).

Segundo Furr (2015) e outros autores, o fluxo de LCR e a sua direção crânio-caudal são devidas à pulsação de sangue no plexo coroide (Snell, 2006). Estas pulsações arteriais elevam a pressão de LCR, fazendo com que este se desloque para as aberturas laterais (De Lahunta *et al.*, 2015). Para este fluxo contribui também, apesar de em menor escala, o movimento dos cílios das células ependimárias (Snell, 2006; Brodbelt & Stoodley, 2010; De Lahunta *et al.*, 2015). A circulação do LCR no espaço subaracnoideu craniano e deste para o que rodeia a medula espinhal, dependem também das pulsações das artérias cerebrais e medulares e da sístole cardíaca (Snell, 2006; De Lahunta *et al.*, 2015). Brodbelt e Stoodley (2010), descrevem ainda a influência da função respiratória sobre o movimento deste líquido entre compartimentos, devido a ondas de pressão que provoca no espaço subaracnoideu.

Nos últimos anos, alguns autores têm vindo a pôr em causa as teorias até aqui aceites, defendendo que a produção de LCR não ocorre maioritariamente no plexo coroide mas sim ao longo dos capilares do SNC, deitando abaixo a teoria da circulação de LCR realizar-se plexo coroide - espaço subaracnoideu, havendo inclusive evidências em humanos de movimentos craniais do líquido (Cook & DeNicola, 1988; Brinker, Stopa, Morrison, & Klinge, 2014). É de salientar que existem estudos que contrariam esta ideia, havendo inclusive dados de Ressonância Magnética (RM) que evidenciam a presença de fluxo ao nível do aqueduto, sendo assim necessário mais estudos para provar qualquer uma das hipóteses (Bateman & Brown, 2012).

### **3.4. Absorção**

O LCR é maioritariamente absorvido pelas vilosidades aracnoides que se projetam para dentro dos seios venosos e veias cerebrais, retornando assim ao sistema venoso. Os seios transversos desempenham nos quadrúpedes a função mais significativa na absorção de LCR.

Uma pequena quantidade é absorvida nas veias e vasos linfáticos que rodeiam os nervos espinhais e que estão associados a alguns nervos cranianos (Cook & DeNicola, 1988; Klein, 2014; De Lahunta *et al.*, 2015; Uemura, 2015; McGeady *et al.*, 2017). Algum LCR ao passar pela lâmina cribiforme do etmóide é aí absorvido, caso contrário escoar para a cavidade nasal, resultando em rinorreia cerebrospinal. É ainda absorvida uma quantidade mínima nos espaços intersticiais do parênquima cerebral, pelos vasos sanguíneos parenquimatosos (De Lahunta *et al.*, 2015).

Normalmente a taxa a que o LCR retorna ao sistema venoso é semelhante à de produção, e necessita de um gradiente de pressão entre o LCR e a pressão venosa dentro dos seios venosos durais para que o líquido atravesse a parede das vilosidades e dos seios venosos, alcançando o sangue (Turner, 2000; Junqueira & Carneiro, 2008; McGeady *et al.*, 2017). Quando a pressão de LCR é superior à pressão venosa (situação normal), as vilosidades aracnoides atuam como válvulas unidirecionais, forçando a passagem de LCR para o seio venoso. Se a pressão venosa estiver aumentada estas válvulas colapsam, impedindo o fluxo retrógrado de sangue venoso (Cook & DeNicola, 1988; Furr, 2015).

Estando aparentemente a absorção dependente da pressão de LCR, quando ocorre aumento da PIC as válvulas abrem mais e a taxa de absorção aumenta (Turner, 2000; Klein, 2014; Hall, 2016). Cook e Denicola (1988), referem ainda que se a pressão intraventricular estiver aumentada, o LCR poderá ser absorvido por vasos sanguíneos dentro do parênquima cerebral após atravessar as células epêndimas. Se pelo contrário, a pressão venosa estiver aumentada, a taxa de absorção será menor (Turner, 2000).

Em certas afeções, como é o caso de meningites ou tumores cerebrais, pode ocorrer obstrução das vilosidades por partículas de grandes dimensões, fibrose ou por um elevado número de hemácias ou leucócitos, bloqueando a absorção de LCR nos seios venosos e, elevando conseqüentemente a pressão de LCR, que em condições normais é essencialmente regulada pela sua absorção nas vilosidades (Klein, 2014; Hall, 2016).

## **4. Colheita de LCR**

### **4.1. Indicações para a colheita de LCR**

A análise de LCR é uma relevante ferramenta de diagnóstico que fornece aos médicos veterinários importantes informações sobre a saúde neurológica do paciente (Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005; Di Terlizzi & Platt, 2009). Estas informações advêm das alterações dos componentes do LCR, que ocorrem aquando da existências de doenças que comprometem a barreira hematoencefálica, sangue-LCR e a interface entre o LCR com o cérebro e a medula espinhal (Lorenz *et al.*, 2011; Wood, Platt & Garosi, 2012). Tipicamente as alterações limitam-se ao número e distribuição das células, ao aumento do conteúdo proteico e à presença de

anticorpos e agentes infecciosos, o que confere a esta análise uma sensibilidade razoável, mas baixa especificidade, visto estas alterações serem limitadas em relação à variedade de doenças neurológicas que existem (Vernau *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2012; De Lahunta *et al.*, 2015;). Assim, é necessário que as alterações no LCR sejam interpretadas como um todo, ou seja, no contexto da história clínica, dos exames físico e neurológico, dos resultados dos exames de diagnóstico complementares concomitantemente realizados, que incluem análises laboratoriais (como por exemplo hemograma, perfil bioquímico, urianálise) bem como mediante os resultados de exames imagiológicos específicos (como por exemplo tomografia computadorizada, RM, mielografia, etc.) (Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005; Vernau *et al.*, 2008; Adamo, 2010; Dewey *et al.*, 2016). Idealmente os exames complementares por imagem são realizados antes da colheita de LCR, uma vez que podem fornecer informações que contraindiquem a realização da punção, como é o caso da presença de massas a nível do SNC que, por compressão, provoquem aumento da PIC (Elias & Brown, 2008; Lorenz *et al.*, 2011). Contudo, no caso de ser administrado algum agente de contraste no espaço subaracnoideu, como nas mielografias, deve sempre, impreterivelmente, proceder-se previamente à colheita de LCR e sua preservação para posterior análise, caso o exame imagiológico não tenha fornecido informação suficiente para um diagnóstico conclusivo final (Wood *et al.*, 2012; Taylor, 2016). Em casos de suspeita de meningite ou meningomielite, esta análise deve ser realizada antes de se proceder à mielografia, uma vez que os agentes de contraste podem exacerbar os sinais clínicos, devido à resposta inflamatória que provocam (Chrisman, 1992; Wamsley, 2014; Dewey *et al.*, 2016).

O estudo do LCR está indicado em pacientes com suspeita de doenças do foro neurológico central quer sejam processos inflamatórios, infecciosos ou autoimunes, degenerativos, traumáticos ou neoplásicos intracranianos ou da medula espinhal. No geral em qualquer afeção que afete o cérebro, como quadros convulsivos, a análise de LCR deve ser tida em conta. Outra indicação para esta análise inclui as lesões que afetam as raízes nervosas espinhais (radiculopatias), visto as meninges envolverem as raízes nervosas até estas se tornarem nos nervos periféricos, podendo assim qualquer doença neste local alterar o LCR, especialmente as doenças inflamatórias. É ainda indicada a análise de LCR na monitorização e consequente avaliação da eficácia da terapêutica instituída para uma determinada doença neurológica (Rusbridge, 1997; Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005; Elias & Brown, 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009; Dewey *et al.*, 2016; Taylor, 2016).

Antes de se proceder à colheita de LCR, é necessário ter em conta que o LCR não se encontra sempre alterado em pacientes com doenças neurológicas (Braund, 2003, citado em Di Terlizzi & Platt, 2009), fornecendo em poucas ocasiões um diagnóstico definitivo por si só, podendo porém ajudar a limitar os diagnósticos diferenciais (Lorenz *et al.*, 2011).

Para a realização da colheita e análise do LCR é necessário a existência de pessoal médico treinado. O clínico que realiza a colheita, para além de treino necessita de perícia e confiança.

Para tal é necessário que o procedimento seja realizado com frequência suficiente para manter a prática e precisão (Lorenz *et al.*, 2011). É também necessária a existência de uma pessoa treinada que realize a análise citológica e a contagem de células, uma vez que estas devem ser realizadas o mais rápido possível, pois as células do líquido começam a degenerar 30 minutos após a colheita (Chrisman, 1992). Assim sendo, este procedimento é realizado em grande parte por veterinários em centros de referência. Ainda assim, o equipamento e a técnica necessária para proceder à colheita e análise de LCR não estão para além dos recursos de um clínico geral (Lorenz *et al.*, 2011).

#### **4.2. A Técnica**

A colheita de LCR é simples e segura se forem realizados os procedimentos adequados. (Taylor, 2015). Destes procedimentos fazem parte a indução anestésica, intubação do paciente e manutenção deste sob anestesia geral, de modo a evitar que o animal se mova e a permitir ao clínico a manipulação do animal conforme lhe convenha (Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005; Elias & Brown, 2008). Todo o procedimento deve ser efetuado de forma asséptica. Como tal, deve ser realizada a tricotomia local, seguida de desinfecção. Em termos de materiais utilizados na punção e armazenamento, estes devem ser estéreis, desde as agulhas espinhais com estilete (de 20 a 22 Gaus e com 38 a 63,5 milímetros), passando pelos tubos de recolha (seco e/ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) de acordo com o laboratório) até às luvas cirúrgicas utilizadas pelo clínico (Rusbridge, 1997; Di Terlizzi & Platt, 2006; Adamo, 2010; Taylor, 2016; Rossmeisl, 2017). Normalmente é colhido entre 1 a 2 ml de LCR, podendo ser colhido com segurança 1 ml por cada 5 kg de peso vivo do animal (Chrisman, 1992; Rossmeisl, 2017).

Existem dois locais de colheita de LCR, a cisterna magna (cisterna cerebelomedular) e a região lombar (espaço subaracnoideu lombar caudal). A cisterna magna é a mais utilizada, por ser de mais fácil acesso, por haver menor probabilidade de ocorrer contaminação da amostra com sangue e por o tamanho da amostra ser maior, quando colhida neste local. Inclusivamente, é o local de colheita mais indicado para a pesquisa de afeções intracranianas, uma vez que o fluxo do LCR corre predominantemente na direção rostro-caudal. Por seu turno, a punção lombar é a eleita para a pesquisa de afeções na medula espinhal (Chrisman, 1992; Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005; Di Terlizzi & Platt, 2006; Adamo, 2010; Taylor, 2016). Independentemente do local escolhido, o clínico que realiza a colheita deverá estar sentado numa cadeira ou de joelhos no chão de modo a que o ponto de inserção da agulha esteja ao nível dos seus olhos (Taylor, 2016).

### 4.3. Punção cisternal

Quando o local de colheita é a cisterna magna, deve ser utilizado, de preferência, um tubo endotraqueal flexometálico, que é resistente a dobras e colapso, evitando assim a oclusão das vias aéreas que pode ser provocada pela vigorosa flexão do pescoço do animal, necessária para o correto posicionamento deste (Elias & Brown, 2008; Taylor, 2016).

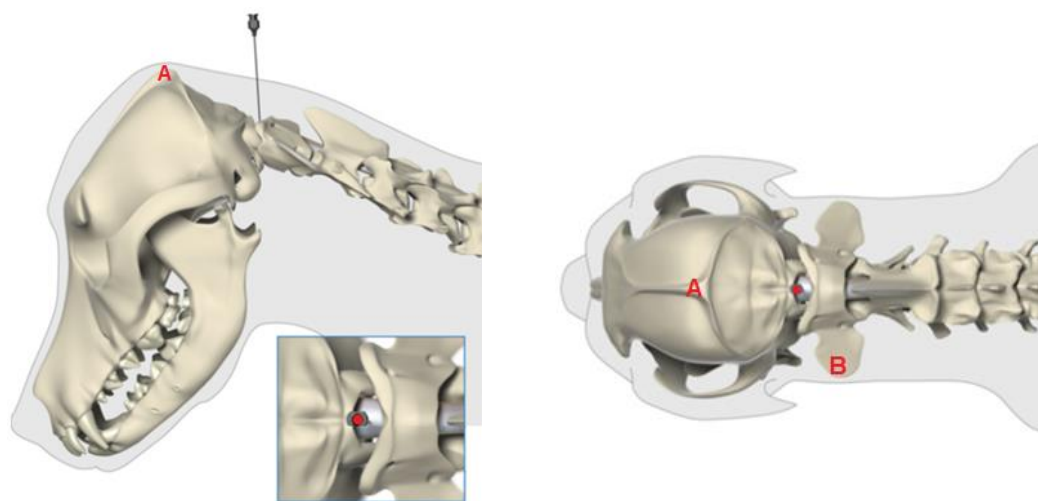
O paciente é colocado em decúbito lateral direito, no caso de clínicos destros, com a cabeça e o dorso junto ao bordo da mesa. Com o auxílio de um assistente o focinho é elevado e fletido 90° de modo a que o eixo sagital da cabeça fique paralelo à mesa e perpendicular à coluna (Wamsley, 2014; Taylor, 2016; Rossmeisl, 2017). Pode ser útil puxar as orelhas do paciente para a frente e colocar algum tipo de suporte, como uma esponja, sob o pescoço, de modo a facilitar o alinhamento do processo espinhoso axial com a protuberância occipital externa (POE) (Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005; Dewey *et al.*, 2016).

Existem várias técnicas para localizar o ponto de inserção da agulha no espaço atlanto-occipital (cisterna magna). Numa das técnicas o local a puncionar é revelado pelo ponto de interceção de duas linhas imaginárias, uma que une os bordos craniais das asas do atlas (C1) e a outra que é desenhada desde a POE até ao processo espinhoso do áxis (C2). Para localizar estas estruturas, o clínico, utilizando a mão não dominante, palpa as asas do atlas com o polegar e o dedo médio e com o dedo indicador localiza a POE (Rusbridge, 1997; Di Terlizzi & Platt, 2009; Lorenz *et al.*, 2011; Taylor, 2016; Dewey *et al.*, 2016). Utilizando também linhas imaginárias, Wamsley (2014) e Mohammad-Zadeh *et al.* (2005), descrevem uma técnica semelhante, mas em que o ponto de inserção da agulha se localiza no centro de um triângulo desenhado pela POE e os bordos mais salientes das asas do atlas. Outra técnica também descrita, utiliza igualmente a mão não dominante para identificar as asas do atlas e a POE. Sendo que neste método, o dedo indicador é movido caudalmente a partir do bordo caudal da POE enquanto se pressiona firmemente a ponta do dedo. Deste modo, é possível palpar uma ligeira depressão no músculo, imediatamente após a POE em direção caudal, sendo o local a puncionar caudal a esta mesma depressão (Adamo, 2010). Já Dewey *et al.*, (2008) preferem avançar cranialmente a partir do processo espinhoso do áxis. Segundo estes autores, na maioria dos pacientes é possível palpar a porção cranial do arco do atlas, a aproximadamente 1/3 da distância entre a porção cranial do áxis e a POE. Neste local é possível sentir uma crista, sendo o local de punção exatamente cranial a esta protuberância (Figura 3) (Dewey *et al.*, 2016).

Enquanto a mão esquerda marca os acidentes anatómicos de referência, a mão direita insere a agulha através da pele (no caso de pessoas destrás). De forma a aumentar a estabilidade da agulha, a mão direita deve estar apoiada na mesa ou no animal (Taylor, 2016). Após a agulha perfurar a pele, o polegar e o dedo indicador da mão esquerda auxiliam a estabilizá-la e a controlar o seu avanço, enquanto que a mão direita avança lentamente a agulha e retira

o estilete. Só no final do processo, quando a agulha tiver de ser retirada, é que a mão esquerda liberta a agulha (Cook & DeNicola, 1988; Elias & Brown, 2008; Dewey *et al*, 2016). A agulha deve ser mantida paralela à mesa e inserida perpendicularmente à coluna e paralelamente ao corpo da mandíbula, devendo ser avançada lentamente, 1 a 2 mm de cada vez. (Rusbridge, 1997; Elias & Brown, 2008; Wamsley, 2014; Taylor, 2016; Rossmeisl, 2017).

Figura 3 - Representação dos pontos de referência anatômicos e determinação do local de inserção da agulha para a colheita de LCR a partir da cisterna magna no cão, vista lateral, dorsoventral e aproximada. A - protuberância occipital externa, B – asa do atlas (Adaptado de Dewey *et al.*, 2016).



Quando se suspeita de doença cerebral, o bisel da agulha é dirigido cranialmente. Já no caso de suspeita de doença medular o bisel é dirigido caudalmente (Taylor, 2016). Todavia, Levine e Levine (2012) referem que o bisel da agulha deve ser apontado cranialmente, numa tentativa de aumentar o fluxo de LCR. Outro método de aumentar o fluxo de LCR consiste em ocluir a veia jugular. Porém, esta técnica pode ser perigosa uma vez que aumenta a pressão intracraniana, podendo em certos casos deteriorar o estado clínico do animal (Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005).

Após a agulha perfurar a pele, os músculos e as fascias, pode ser sentida uma ligeira perda de resistência (referida por alguns autores como um “pop”), que indica que a agulha atravessou a membrana atlanto-occipital e as meninges, alcançando o espaço subaracnoideu (cisterna magna). Nesta altura o estilete é retirado e o LCR corre através da agulha, sendo colhido para os devidos tubos (Rusbridge, 1997; Adamo, 2010; Lorenz *et al*, 2011;). No entanto, esta sensação não ocorre em todos os pacientes, principalmente em cães pequenos, pelo que o estilete deve ser removido frequentemente, de forma a conferir a penetração subaracnoídea pelo aparecimento de LCR no canhão da agulha (Cook & DeNicola, 1988; Elias & Brown, 2008; Di Terlizzi & Platt, 2009).

Cook e DeNicola (1988) defendem explicitamente que a agulha nunca deve avançar sem o estilete completamente inserido, e Adamo (2010) afirma que este método aumenta a probabilidade de obstrução da agulha por tecidos ou coágulo, para além de ser mais nocivo para os tecidos nervosos. Porém, para Lorenz *et al.* (2011) outra opção passa por remover o estilete após a pele ter sido transposta, antes de avançar mais a agulha. Defendendo estes autores que utilizando esta técnica, a contaminação do LCR com células sanguíneas é mínima, para além de diminuir o risco de lesão iatrogénica dos tecidos nervosos, uma vez que o LCR flui assim que seja atingido o espaço subaracnoideu.

Quando a cisterna magna é alcançada, aparece LCR no canhão da agulha. Quando tal não acontece, o estilete deve ser recolocado e a agulha avançada 1 a 2 mm de cada vez, confirmando entre cada movimento se flui LCR (Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005). Se a agulha atingir o osso, esta deve ser ligeiramente recuada e redirecionada caudal ou cranialmente, mas se tal não for possível, a agulha deve ser removida e as estruturas anatómicas de referência novamente estudadas, repetindo o processo com uma agulha nova (Wamsley, 2014).

A recolha de LCR tanto pode ser feita deixando as gotas caírem do canhão da agulha para um tubo ou aspirando-as com uma seringa conforme estas se formem na extremidade do canhão, mas nunca acoplando a seringa à agulha (Wamsley, 2014). Quando já tiver sido colhida uma quantidade suficiente de LCR a agulha pode ser removida lentamente, sem o estilete (Elias & Brown, 2008).

#### **4.4. Contraindicações e complicações**

A colheita de LCR não é isenta de riscos. Para começar, é necessário recorrer à anestesia geral, o que está associado a riscos, embora pouco comuns, sendo significativos especialmente em pacientes com doenças intracraniana (Di Terlizzi & Platt, 2009; Wamsley, 2014). Sendo a técnica contraindicada para pacientes com elevado risco anestésico estes não a deverão realizar, todavia, uma alternativa seria a realização da colheita por punção lombar com o animal sedado ou com anestesia regional (epidural) (Dewey *et al.*, 2016; Taylor, 2016). Uma das principais contraindicações é a suspeita de aumento da PIC. Durante a punção o espaço subaracnoideu torna-se contínuo com o exterior, de modo que a pressão rapidamente se equilibra entre os dois espaços. Assim, quando existe aumento da PIC a taxa de LCR através da agulha é maior, o que pode levar a herniação dos tecidos nervosos. (Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005; Wood *et al.*, 2012). Tipicamente a herniação do cérebro ou cerebelo ocorrem numa direção caudal, ao nível do tentório ósseo ou do forame magno, podendo levar à morte do animal (Elias & Brown, 2008; Wood *et al.*, 2012; Dewey *et al.*, 2016). Deste modo, quando o fluxo de LCR é demasiado rápido, a agulha deve ser removida e deve ser avaliada a necessidade de terapêutica com um diurético osmótico (Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005).

O risco de herniação diminui se se recorrer a tomografias computadorizadas ou ressonâncias magnéticas antes de proceder à colheita de LCR (Adamo, 2010). Estes exames permitem identificar pacientes já com hérnias ou em risco de as formarem, como é o caso de animais com lesões intracranianas de grandes dimensões com efeito de massa, traumatismo craniano, hidrocefalia ativa ou descompensada ou edema cerebral (Cook & DeNicola, 1988; Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood *et al.*, 2012). De notar que no caso das doenças inflamatórias a PIC aumenta apenas ligeiramente, não sendo suficiente para causar problemas (Elias & Brown, 2008). Nos animais com suspeita ou com sinais clínicos de aumento da PIC, a colheita não deve ser realizada (Rusbridge, 1997; Elias & Brown, 2008), pelo menos sem que antes seja feita uma terapêutica com manitol endovenoso e com ventilação dos pacientes de modo a atingir e manter uma  $\text{PaCO}_2$  aproximadamente entre os 30 e os 35 mmHg de forma a reduzir a PIC (Wamsley, 2014). Devido à tese de que o uso de quetamina nos protocolos anestésicos eleva a PIC, o uso desta em pacientes com suspeita de PIC aumentada é desaconselhada por Wamsley (2014). Contudo, nos últimos anos, em medicina humana esta tese tem sido abandonada após diversos estudos revelarem que não existe um risco acrescido no uso deste fármaco nos protocolos anestésicos (Wang *et al.*, 2014; Cohen *et al.*, 2015; Green, Andolfatto, Krauss, 2015).

A complicação mais comum na colheita de LCR é a contaminação da amostra com sangue. Se a agulha perfurar um vaso do plexo venoso vertebral o líquido que aparece no canhão é francamente hemorrágico, pelo que a agulha deve ser retirada imediata, mas lentamente e o processo reiniciado. No entanto é necessário distinguir hemorragia franca de LCR hemorrágico. Por vezes o líquido começa por vir ligeiramente sanguinolento, contaminado por sangue com origem em vasos meníngeos lesados ou por contaminação da agulha durante o seu avanço através dos tecidos. Nestes casos as primeiras gotas devem ser desprezadas, sendo recolhidas para análise apenas quando começam a vir translúcidas. Mas se continuar sanguinolento, deve ainda assim, ser colhida uma amostra, uma vez que esta contaminação pode ser devida a um processo patológico. (Cook & DeNicola, 1988; Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005; Elias & Brown, 2008).

A aspiração do LCR não deve ser feita com a seringa acoplada diretamente à agulha, uma vez que a pressão negativa que esta gera irá provocar uma diminuição abrupta na pressão de LCR, o que pode potenciar quadros hemorrágicos ou quadros de herniação cerebral/cerebelar, para além de ao se aspirar tecido nervoso em direção à agulha, algumas células sanguíneas e/ou meníngeas poderem causar uma obstrução à passagem de LCR e contaminar a amostra. O mesmo pode ocorrer se for colhida uma quantidade de LCR excessiva (Cook & DeNicola, 1988; Lorenz *et al.*, 2011; Wamsley, 2014). É ainda de salientar que o risco de herniação é igual nos dois locais de punção, visto o espaço subaracnoideu ser contínuo entre estes dois locais (Wood *et al.*, 2012).



Outras contraindicações à colheita de LCR incluem trombocitopenia ou outras coagulopatias, instabilidade ou suspeita de doença no local da colheita (ex: instabilidade atlanto-occipital), traumatismo na coluna vertebral ou malformações do tipo Chiari <sup>2</sup>(Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood *et al.*, 2012; Rossmeist, 2017).

Um potencial risco na colheita de LCR reside na possibilidade de introdução de agentes infecciosos no SNC por uma técnica de assepsia defeituosa (Cook & DeNicola, 1988). Também um potencial risco iatrogénico reside na possibilidade de lesão do tronco cerebral ou da medula espinhal, pela punção inadvertida do parênquima com a agulha, provocando lesões neurológicas que ao nível do tronco cerebral podem levar a alterações vestibulares temporárias, a cessação da respiração voluntária ou até à morte (Adamo, 2010; Taylor, 2016). Por este motivo, De Lorenzi e Mandara (2016) recomendam o abandono da técnica após três tentativas de colheita sem sucesso.

## **5. Análise de LCR**

A análise de rotina de LCR inclui a avaliação macroscópica, a análise quantitativa e a avaliação microscópica, avaliando-se uma série de parâmetros dentro de cada tipo de exame (De Lorenzi & Mandara, 2016). O manuseamento do LCR requer cuidados, nomeadamente no que é respeitante aos tubos de recolha e ao tempo até ao processamento da amostra. Por esta razão aconselha-se o contacto prévio com o laboratório que realizará a análise (Di Terlizzi & Platt, 2009; Marcos & Santos, 2011). A contagem de células e a preparação citológica do líquido deve ser realizada dentro de 30 a 60 minutos após a colheita, uma vez que a baixa concentração proteica do LCR leva à rápida lise celular (De Lorenzi & Mandara, 2016). Quando este período de tempo é ultrapassado ocorre distorção da morfologia celular e diminuição do número de células nucleadas, sendo as células mononucleares mais afetadas por esta distorção que os neutrófilos (Fry, Vernau, Kass & Vernau, 2006; Marcos & Santos, 2011).

Quando não for possível o processamento da amostra dentro do referido período de tempo, esta deve ser refrigerada de modo a retardar a degeneração celular (De Lorenzi & Mandara, 2016; Taylor, 2016). Recomenda-se ainda a sua divisão por dois tubos, um sem fixador e outro com fixador (Di Terlizzi & Platt, 2009; Marcos & Santos, 2011; Levine & Levine, 2012; Taylor, 2016). Ao longo da literatura estão descritos vários métodos de conservação, como é o caso da adição de álcool (50 a 90%) ou de soro autólogo (10 a 20%) (Marcos & Santos, 2011). A amostra assim conservada será utilizada para a contagem diferencial de células e

---

<sup>2</sup> Malformações do tipo Chiari são defeitos congénitos ao nível da junção crânio-cervical. Devida a uma hipoplasia do osso supraoccipital o tamanho da fossa caudal é menor, podendo causar compressão do tronco encefálico e do cerebelo, herniação do cerebelo através do forâmen magno, torção da medula espinhal e perturbações do fluxo do LCR ao nível desta junção. Esta malformação é mais frequentemente encontrada em cães da raça Cavalier King Charles Spaniels (Muñana, 2014; Platt & Freeman, 2014; Loughin, 2015).

avaliação morfológica (De Lorenzi & Mandara, 2016). Alguns laboratórios solicitam a utilização específica de tubos com EDTA de modo a preservar a arquitetura celular (Levine & Levine, 2012). Contudo, devido ao facto de os fixadores e conservantes alterarem a concentração proteica e diluírem a concentração celular, a avaliação bioquímica e a contagem de células total deverão ser realizadas na amostra guardada em tubo seco (Marcos & Santos, 2011; Levine & Levine, 2012; De Lorenzi & Mandara, 2016).

### **5.1. Avaliação macroscópica**

Ao nível macroscópico é avaliado no LCR a sua coloração e turvação (Di Terlizzi & Platt, 2009). Um LCR normal é incolor (De Lorenzi & Mandara, 2016). A presença de sangue, tanto devido a contaminação durante a colheita como devido a uma hemorragia causada por um processo patológico, confere ao LCR uma coloração vermelha ou rosada (Di Terlizzi & Platt, 2009). Nestes casos a centrifugação do líquido permite distinguir entre a presença de eritrócitos ou de hemoglobina (Marcos & Santos, 2011). No primeiro caso, acumulam-se células vermelhas no fundo do tubo e o sobrenadante torna-se transparente. Já no segundo caso o sobrenadante permanece corado, com uma coloração amarelo-alaranjado (xantocromia) devido à acumulação de oxihemoglobina ou metahemoglobina resultantes da degradação de eritrócitos (Cook & DeNicola, 1988; Di Terlizzi & Platt, 2009). Um LCR xantocrómico pode estar relacionado a hemorragia devido a traumatismo, vasculite, extrusão de disco, inflamação grave ou neoplasia. Mais raras vezes é causado por leptospirose, toxoplasmose, criptococose, coagulopatias, hiperbilirrubinemia ou mielopatia isquémica (De Lorenzi & Mandara, 2016). Foram realizados estudos que concluíram que a inspeção visual não é sensível para a deteção de xantocromia, sendo recomendada a avaliação por espectrofotometria (Petzold, Keir e Sharpe, 2004; Sidman, Spitalnic, Demelis, Durfey e Jay, 2005).

Em relação à turvação, um LCR normal é translúcido (Marcos & Santos, 2011). Quando este se encontra mais turvo, tal deve-se à existência de partículas neste líquido, normalmente devido ao aumento da celularidade da amostra (Cook & DeNicola, 1988; Di Terlizzi & Platt, 2009). A avaliação microscópica permitirá posteriormente conhecer especificamente os tipos celulares presentes (Cook & DeNicola, 1988). É necessária a presença de 200 leucócitos/ $\mu$ l ou 700 eritrócitos/ $\mu$ l para que seja detetada uma ligeira turvação no líquido (Marcos & Santos, 2011; De Lorenzi & Mandara, 2016).

## 5.2. Análise quantitativa

Utilizando um simples refratômetro pode ainda ser determinada a densidade da amostra. Ainda assim, o valor desta medição tem vindo a ser posto em causa, uma vez que a maioria das amostras com alterações encontram-se dentro intervalo de referência, de 1004 a 1006, sendo apenas detetadas alterações quando existe um aumento acentuado das proteínas totais (Cook & DeNicola, 1988).

### 5.2.1. Teor em proteína

A quantidade de proteínas no LCR é extremamente baixa e varia consoante o local de colheita (Levine & Levine, 2012). Devido ao fluxo tendencialmente crânio-caudal do LCR, a concentração de proteínas difere entre amostras colhidas na cisterna magna (menos de 25 a 30 mg/dl) e amostras colhidas na cisterna lombar (menos de 45 mg/dl) (Chrisman, 1992; De Lorenzi & Mandara, 2016). Estes valores baixos não são detetados por refratometria convencional (Marcos & Santos, 2011; Wamsley, 2014). Como alternativa às determinações quantitativas realizadas em laboratórios especializados recorre-se às tiras de análise de urina, que permitem uma avaliação semiquantitativa (Marcos & Santos, 2011; De Lorenzi & Mandara, 2016). Nestas tiras ocorre uma mudança de cor, que é interpretada como indicado na tabela 1 (Marcos & Santos, 2011). Podem ocorrer falsos positivos ou negativos na interpretação de 0 e 1+, mas, as restantes leituras são fiáveis e representam efetivamente um verdadeiro aumento da concentração proteica da amostra (Di Terlizzi & Platt, 2009).

Uma vez que para além da albumina, que representa 80 a 95% das proteínas totais do LCR, estão presentes ainda outras proteínas, as globulinas. As tiras de análise de urina são altamente específicas para as primeiras e menos para as segundas. A medição das globulinas é realizada através do teste de Pandy (Di Terlizzi & Platt, 2009; De Lorenzi & Mandara, 2016). Este teste consiste na adição de 2 a 4 gotas de LCR a 1 ml de reagente Pandy (ácido carbólico a 10%). A solução tornar-se turva quando o teor em globulinas se encontra aumentado e superior a 50 mg/dl. Num LCR normal a transparência deste mantém-se, Pandy negativo (Marcos & Santos, 2011).

Tabela 1 - Escalas de interpretação da proteína das tiras de análise de urina (fonte: Marcos & Santos, 2011).

LCR normal	LCR alterado		
0	1+	2+	3+
<30 mg/dl	=30 mg/dl	=100 mg/dl	=500 mg/dl

### 5.2.2. Contagens celulares

Inversamente ao que se verifica com as proteínas, as contagens celulares são ligeiramente mais elevadas na cisterna magna que na cisterna lombar (De Lorenzi & Mandara, 2016). Dito isto, o LCR possui concentrações celulares demasiado baixas para que os contadores automáticos normalmente utilizados em hematologia sejam utilizados para realizar as contagens celulares. Tal facto tornou o uso do hemocitómetro (câmara de Neubauer) o método padrão para as contagens de eritrócitos e de células nucleadas (Di Terlizzi & Platt, 2009; Marcos & Santos, 2011). Atualmente estão a ser investigados novos aparelhos de análise hematológica com capacidade para detetar e diferenciar as baixas concentrações celulares do LCR, tendo os seus resultados tido uma boa correlação na maioria dos aspetos com as técnicas manuais (Wood *et al.*, 2012). Num estudo realizado por Ruotsala, Poma, Costa e Bienzle em 2008, sobre um destes aparelhos, foi concluído que a correlação entre contagem celular e diferenciação celular realizada pelo aparelho e a realizada manualmente com o hemocitómetro é moderada para os leucócitos e excelente para os eritrócitos, tendo porém sido obtidas diferenciações celulares muito variáveis. Num estudo mais recente, outros aparelhos foram estudados, concluindo-se que ambos os métodos automatizados mostraram uma precisão melhorada para a contagem de leucócitos comparativamente ao método manual (Sandhaus, Dillman, Hinkle, MacKenzie & Hong, 2017).

A técnica manual, com recurso ao hemocitómetro encontra-se descrita no capítulo IV- 2.6. Análise laboratorial, porém, são aqui fornecidas algumas informações sobre a sua interpretação.

Os eritrócitos e as células nucleadas são contados separadamente (Di Terlizzi & Platt, 2009). No entanto é de realçar que um LCR normal não deve conter eritrócitos, sendo a presença destes geralmente devida a contaminação com sangue durante a colheita (Levine & Levine, 2012; Wamsley, 2014). Sabe-se que algumas afeções podem explicar a presença desta contaminação, pelo que um LCR com uma coloração avermelhada ao exame macroscópico ou com uma contagem de eritrócitos elevada não deve ser descartado, prosseguindo para exame citológico (Chrisman, 1992; Levine & Levine, 2012).

Um número de leucócitos no LCR para além do intervalo de referência denomina-se de pleocitose (Desnoyers, Bédard, Meinkoth e Crystal, 2008; Levine & Levine, 2012; Wamsley, 2014). O LCR de um cão saudável deve ter 5 células/ $\mu$ l ou menos, tanto quando colhido na cisterna magna como na lombar (Marcos & Santos, 2011; Levine & Levine, 2012; Wamsley, 2014). A pleocitose é caracterizada após o exame microscópico, na contagem diferencial de células, baseando-se nos leucócitos predominantes na amostra (Wamsley, 2014). Contagens normais de células nucleadas não excluem a necessidade de uma avaliação da morfologia celular e de contagem diferencial de células, uma vez que contagens normais não excluem

alterações na distribuição e no tipo e morfologia celular (Wood *et al.*, 2012; De Lorenzi & Mandara, 2016).

### **5.3. Avaliação citológica**

Devido ao baixo número celular do LCR, é necessário recorrer a técnicas de concentração para proceder à sua avaliação microscópica (Di Terlizzi & Platt, 2009, Marcos & Santos, 2011, Wood *et al.*, 2012). Para tal, existem várias técnicas disponíveis, sendo a utilização de uma citocentrífuga considerada a técnica de eleição (Garma-Avina, 2004). Contudo, estes aparelhos são dispendiosos e não se encontram disponíveis em todos os centros veterinários, recorrendo-se nestes casos a alternativas mais económicas, como a técnica da sedimentação ou a técnica da filtração por membrana (Marcos & Santos, 2011; De Lorenzi & Mandara, 2016). A última técnica referida necessita de uma coloração especial que não está normalmente disponível, pelo que ao longo dos anos têm-se desenvolvido e sido descritas várias técnicas de sedimentação práticas e adequadas para se utilizarem em clínicas ou laboratórios (Garma-Avina, 2004; De Lorenzi & Mandara, 2016).

A avaliação de várias amostras do mesmo paciente ou de uma amostra de grande volume apresenta a vantagem de aumentar as hipóteses de deteção de pequenas alterações no LCR (De Lorenzi & Mandara, 2016).

#### **5.3.1. LCR normal**

As células predominantes no LCR de um cão saudável são mononucleares (Tabela 2). Estas constituem uma mistura de células mononucleares de grande tamanho com outras de pequeno (Desnoyers *et al.*, 2008). A classificação destas células quanto ao tipo e quanto à sua prevalência no LCR não reúne o consenso de vários autores. Para Wamsley (2014) e outros, as células em maioria num LCR normal são os linfócitos (60 a 70%). Classificam ainda as células mononucleares de grande tamanho como células fagocíticas, quer estejam ou não vacuolizadas e quer contenham ou não material fagocitado (Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood *et al.*, 2012; Cook & Levine, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016). Contudo, Marcos e Santos (2011), consideram as células predominantes monocitoides. Estas possuem um tamanho equivalente a 1,5 a 2 eritrócitos, núcleo redondo a oval e citoplasma azul-claro. Estes autores denominam ainda estas células mononucleares de grande tamanho como macrófagos apenas quando apresentam material fagocitado no seu citoplasma (Desnoyers *et al.*, 2008; Marcos & Santos, 2011). Deste modo, descrevem os linfócitos como as segundas células mais comuns, apresentando um tamanho de 1 a 1.5 eritrócitos e semelhantes aos encontrados no sangue (Marcos & Santos, 2011).

A percentagem de neutrófilos consideradas normais num LCR também não reúne consensos, com alguns autores a considerarem normal a presença de neutrófilos até 10% e eosinófilos até 1% do número total de células nucleadas (Desnoyers *et al.*, 2008; De Lorenzi & Mandara, 2016). Outros, consideram que a presença de neutrófilos e eosinófilos deve ser menor que 2% (Wood *et al.*, 2012; Wamsley, 2014).

O fundo é normalmente incolor e esporadicamente podem ser encontrados eritrócitos e queratinócitos, respetivamente resultado de contaminação com sangue e com pele, para além de células do plexo coróide, ependimais, meníngeas ou até figuras mitóticas (Cook & Levine, 2014; Wamsley, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016).

Mais uma vez, é importante reforçar a ideia de que a ausência de alterações no LCR não exclui a possibilidade de doença neurológica (Tipold, 1995; De Lorenzi & Mandara, 2016).

Tabela 2 - Sumário dos componentes avaliadas nas análises de rotina de LCR e intervalos de referência: (extraído de Di Terlizzi & Platt, 2009).

<b>Avaliação macroscópica</b>	<b>Intervalos de referência</b>
<b>Cor</b>	Incolor
<b>Turvação</b>	Límpido
<b>Eritrócitos</b>	Raros ou nenhuns
<b>Contagem total de células nucleadas</b>	0 a 5 células / $\mu$ l
<b>Proteínas totais</b>	<30 mg / dl (cisterna magna) <45 mg / dl (cisterna lombar)
<b>Avaliação microscópica</b>	<b>Intervalos de referência</b>
<b>Contagem diferencial de células</b>	Predominância de linfócitos e monócitos, poucos neutrófilos segmentados não degenerados e raros eritrócitos

### 5.3.2. Alterações na análise do LCR

#### 5.3.2.1. Contaminação com sangue

Tal como referido anteriormente, o LCR de cães saudáveis não contém eritrócitos (Di Terlizzi & Platt, 2009). No entanto durante a colheita, especialmente por punção lombar, pode ocorrer contaminação com sangue, associada à penetração dos seios venosos vertebrais dorsais ou de pequenos vasos meníngeos (Doyle & Solano-Gallego, 2009; Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood

*et al.*, 2012). Amostras contaminadas com sangue podem apresentar uma coloração rosada ou mesmo vermelha (Desnoyers *et al.*, 2008).

Vários autores defendem que a contaminação com sangue inevitavelmente altera a contagem celular e a concentração proteica da amostra (Wood *et al.*, 2012). Como tal, várias fórmulas foram criadas com o fim de corrigir estas alterações (ex: adicionar 1 célula nucleada/ $\mu$ l por cada 100 ou 500 eritrócitos/ $\mu$ l), porém, estas demonstraram não ser precisas e de confiança (Wilson & Stevens, 1977; Sweeney & Russell, 2000; Cook & Levine, 2014).

Segundo um estudo realizado sobre os efeitos da contaminação sanguínea iatrogénica de LCR, a contagem de eritrócitos não se correlaciona significativamente com a contagem de células nucleadas ou com a concentração proteica em cães normais ou em cães com doença neurológica. Concluindo que o aumento do número de células nucleadas e de proteína é indicativo de doença neurológica, inclusive em amostras contaminadas até 13200 eritrócitos/ $\mu$ l (Hurt e Smith, 1997).

Um outro estudo realizado por Doyle e Solano-Gallego (2009) em 106 cães concluiu que em LCR com contagens de células nucleadas menores ou iguais a 5/ $\mu$ l, a contaminação com sangue (mais de 500 eritrócitos/ $\mu$ l) afeta significativamente a concentração proteica, a percentagem de neutrófilos e a presença de eosinófilos, interferindo com a interpretação destes parâmetros e do seu valor de diagnóstico quando nos encontramos perante alterações no SNC. Porém, a presença de macrófagos ativados e de linfócitos reativos não é significativamente afetada pela contaminação sanguínea, sugerindo que a presença destas células pode ser um indicador mais específico de doença neurológica em pacientes com a amostra de LCR contaminada com sangue e com baixa contagem de células nucleadas.

Em amostras contaminadas com sangue, a interpretação do aumento do número de células nucleadas e da concentração proteica deve ser feita de forma crítica e ter em conta outros factos pertinentes ao caso (Cook & Levine, 2014). Todavia, como regra geral, amostras com mais de 3000 eritrócitos/ $\mu$ l devem ser repetidas (J. Parent citado em Desnoyers *et al.*, 2008). A colheita pode ser repetida em 24 horas (Wood *et al.*, 2012).

#### **5.3.2.2. Alterações na concentração proteica. Dissociação citoalbuminénica**

Apesar da elevação da concentração de proteínas no LCR ser um indicador sensível de doença no SNC, esta é a alteração menos específica possível de ser observada na análise de LCR, sendo o seu aumento quase sempre acompanhado por um aumento paralelo da contagem celular (Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood *et al.*, 2012).

A elevação da concentração proteica no LCR pode ser causada por perda da BHE ou devido à produção intratecal de globulinas (Wood *et al.*, 2012; Levine & Levine, 2012; De Lorenzi & Mandara, 2016). Outra situação bastante frequente que também eleva as proteínas é a

contaminação com sangue, mas esta é facilmente detetada na avaliação citológica (Marcos & Santos, 2011; Levine & Levine, 2012).

Nem sempre o aumento das proteínas é acompanhado por uma elevação da contagem de leucócitos. Tal situação denomina-se de dissociação citoalbuminémica (Marcos & Santos, 2011; Levine & Levine, 2012; Cook & Levine, 2014). A dissociação citoalbuminémica pode ser causada por diversas doenças, estas podem provocar alterações na BHE permitindo a passagem das proteínas do sangue para o SNC, ou causar a obstrução ao fluxo e à absorção de LCR com consequente diminuição do escoamento de proteínas para o sistema venoso e acumulação destas no LCR, ou levar à produção intratecal de proteínas ou ainda caso provoquem lesão tecidual ou necrose localizada (Cook & Levine, 2014; Wamsley, 2014). Estas são alterações não específicas que indicam lesão no SNC, podendo ter uma etiologia bastante variada (Cook & Levine, 2014), apesar de se acreditar ser uma situação mais comum em etiologias não inflamatórias (Levine & Levine, 2012). A tabela 3 enumera as doenças que podem causar dissociação citoalbuminémica.

Tabela 3 - Possíveis causas de dissociação citoalbuminémica (adaptado de Wood *et al.*, 2012).

Mielopatia degenerativa (aumento ligeiro a moderado das proteínas)

Vasculite ou lesão vascular com hemorragia

Produção intratecal de globulinas causada por uma infeção (ex: esgana)

Episódio convulsivo recente

Polirradiculoneurite

**Doenças com possível elevação concomitante da percentagem de neutrófilos:**

Compressão extradural da medula espinhal (ex: doença discal)

Traumatismo

Lesão isquémica (ex: êmbolo fibrocartilaginoso – proteína mais elevada caudalmente à lesão)

Neoplasia (por necrose tecidual, produção de globulinas ou com vasos sanguíneos)

Doenças inflamatórias do SNC também podem provocar alterações semelhantes à dissociação citoalbuminémica quando previamente à colheita é realizada terapêutica com glucocorticoides ou antibióticos, diminuindo artificialmente as contagens de leucócitos. A presença de neutrófilos hipersegmentados (núcleo com mais de 5 segmentos) permite desconfiar da administração prévia de glucocorticoides (Wamsley, 2014).

Um aumento das proteínas no LCR, com ou sem aumento concomitante da contagem de células nucleadas e/ou alterações citológicas pode ocorrer em doenças inflamatórias, compressivas, degenerativas ou neoplásicas (De Lorenzi & Mandara, 2016).



O teor proteico do LCR aumenta mais nas situações de inflamação das meninges ou de regiões superficiais do parênquima cerebral em comparação com as lesões mais afastadas do espaço subaracnoideu (Cook & Levine, 2014).

#### **5.3.2.3. Alterações na percentagem de leucócitos sem pleocitose**

Várias afeções neurológicas podem provocar um aumento da percentagem de neutrófilos ou de eosinófilos sem que a contagem de leucócitos também se eleve (De Lorenzi & Mandara, 2016). Excluindo a hipótese de contaminação com sangue, um aumento dos neutrófilos acima dos 10 a 20% da contagem de células nucleadas e de eosinófilos acima de 1% não devem ser considerados um achado normal do exame citológico. O aumento da percentagem de neutrófilos pode ocorrer em estados iniciais ou ligeiros de doença inflamatória, doença dos discos intervertebrais, traumatismo agudo do SNC ou medula espinhal, em lesões distantes do espaço subaracnoideu ou do local de colheita ou ainda devido a redução da resposta inflamatória por parte de recurso a corticoterapia e antibioterapia prévia. Um aumento da percentagem de eosinófilos pode ser devido a migração parasitária ou a doença provocada por protozoários, como por exemplo *Neospora caninum* (Desnoyers *et al.*, 2008; Cook & Levine, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016).

#### **5.3.2.4. Aumento da contagem de células nucleadas**

Tal como anteriormente referido, o termo pleocitose refere-se a uma elevação da contagem de células no LCR (Desnoyers *et al.*, 2008; De Lorenzi & Mandara, 2016; Moore & Barger, 2017). Esta é definida pelo tipo de células predominantes na amostra, podendo classificar-se como pleocitose neutrofílica, eosinofílica, mononuclear ou mista (De Lorenzi & Mandara, 2016). Este tipo de organização ajuda a estreitar e perceber qual o processo patológico em questão, apesar de raramente existir um tipo específico de pleocitose para uma determinada doença (Moore & Barger, 2017). No anexo I encontram-se descritos alguns achados citológicos e seus diagnósticos diferenciais.

Tal como no resto do corpo, a população de células inflamatórias presentes no LCR também evolui. Possessos inflamatórios mais agudos ou em decurso, mais provavelmente contém neutrófilos, ocorrendo uma mudança com a cronicidade do processo para monócitos/macrófagos e linfócitos (Moore & Barger, 2017).

Quanto maior o envolvimento meníngeo e endotelial, maior o número de leucócitos que se espera observar no LCR (Dewey *et al.*, 2016). O grau da pleocitose é definido pelo número de células nucleares existentes por  $\mu\text{l}$ , contudo, os limites que estabelecem os diferentes graus diferem consoante a bibliografia (tabela 4). Esta quantificação deve ser sempre

realizada, uma vez que auxilia a relacionar as pleocitoses com as doenças mais frequentes (Marcos & Santos, 2011). No anexo II encontra-se uma tabela com alguns diagnósticos diferenciais com base na contagem total de células nucleadas.

Tabela 4- Limites de cada grau de pleocitose consoante diferentes autores.

Tipo Pleocitose	Autor(s)	De Lorenzi & Mandara	Chrisman (1992);
		(2016)	Marcos & Santos (2011)
<b>pleocitose ligeira</b>		de 6 a 50 células/ $\mu$ l	de 6 a 50 células/ $\mu$ l
<b>pleocitose moderada</b>		de 51 a 200 células/ $\mu$ l	de 51 a 500 células/ $\mu$ l
<b>pleocitose grave</b>		Superior a 200 células/ $\mu$ l	Superior a 500 células/ $\mu$ l

#### 5.3.2.4.1. Pleocitose mononuclear

Na pleocitose mononuclear as células mononucleares correspondem a mais de 75% da contagem celular (Marcos & Santos, 2011). A forma mais comum deste tipo de pleocitose é a pleocitose linfocítica, que é caracterizada por uma contagem de células nucleadas elevada, com mais de 50% de linfócitos, sendo constituída maioritariamente por linfócitos pequenos e maduros, por um pequeno número de linfócitos reativos e por grandes células monocitoides (Wood *et al.*, 2012). Este tipo de pleocitose encontra-se tipicamente associada a infeções virais (Marcos & Santos, 2011; Wood *et al.*, 2012; Wamsley, 2014), como é o caso da esgana, na qual a contagem celular se encontra normalmente abaixo das 50 células/ $\mu$ l (Wood *et al.*, 2012). Apesar de serem descritas como características de cães com esgana, a observação de inclusões intracitoplasmáticas eosinófilas no LCR é bastante rara (Abate, Bollo, Lotti & Bo, 1998; Marcos & Santos, 2011).

Para além das infeções virais, a linfocitose pode estar relacionada com outras etiologias, nomeadamente condições inflamatórias, como a meningoencefalite granulomatosa (MEG), a meningoencefalite necrotizante (MEN), a leucoencefalite necrotizante (LEN) e a meningite-arterite responsiva a esteroides (MARE) (apesar desta última tipicamente provocar uma pleocitose neutrofílica), polirradiculoneurite e, menos frequente, linfomas (Marcos & Santos, 2011; Wamsley, 2014; Moore & Barger, 2017). A MEN, antes conhecida como encefalite dos Pug, é essencialmente descrita em cães de pequeno porte (Cooper *et al.*, 2014; Wamsley,

2014). Esta associa-se a uma pleocitose moderada a grave tipicamente linfocítica, apresentando-se, todavia, por vezes como uma pleocitose de células mistas (Dewey, 2016). Uma das condições neurológicas que se caracteriza por apresentar um LCR com uma pleocitose de baixo grau com predomínio de linfócitos é o síndrome de “Shaker dog”, que ocorre em animais jovens e de raças de pequeno porte (Marcos & Santos, 2011).

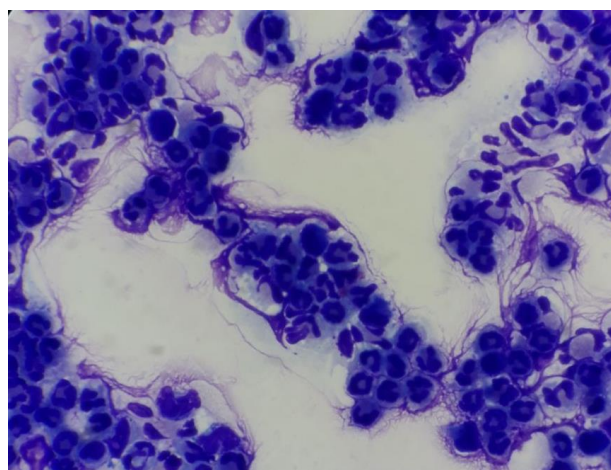
Pode ser ainda causada por vários agentes infecciosos, nomeadamente: infeções por agentes bacterianos (após instituição de antibioterapia) como riquetsias (erliquiose), protozoários (toxoplasmose e neosporose), ou ainda devido a uremia, quadros de intoxicação, reação vacinal ou causas traumáticas, como é o caso da doença do disco intervertebral e discoespondilite (Marcos & Santos, 2011; Wamsley, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016; Moore & Barger, 2017).

Células monocitoides e macrófagos podem também predominar nestas afeções, sendo estas células tipicamente vistas em casos de doença crónica, e comumente nas infeções por *Cryptococcus*, podendo também acompanhar condições hemorrágicas. Alguns tumores primários do SNC, como os astrocitomas, libertam células citologicamente similares a macrófagos, podendo o LCR ser erradamente classificado como tendo uma pleocitose mononuclear (De Lorenzi & Mandara, 2016; Moore & Barger, 2017).

#### **5.3.2.4.2. Pleocitose neutrofílica**

Pleocitose neutrofílica refere-se à presença de mais de 75% de neutrófilos no LCR (Figura 4) (Marcos & Santos, 2011). No entanto, segundo Wood *et al.* (2012) devem ser tidas em consideração doenças que se sabe provocarem pleocitose neutrofílica quando os neutrófilos constituem mais de 2% das células nucleadas, sejam ou não os neutrófilos as células predominantes.

Figura 4 - Pleocitose neutrofílica, coloração diff-quick (fotografia gentilmente cedida por Dra. Joana Sismeiro).



Uma elevação do número de neutrófilos no LCR é vista em processos inflamatórios agudos (Moore & Barger, 2017). Uma das causas mais comuns e, exemplo clássico, deste tipo de pleocitose é a MARE, doença que afeta tipicamente, mas não exclusivamente, cães jovens de raças médias a grandes, como é o caso dos Beagles, Boiadeiros de Berna, Boxers e Bracos alemães de pelo duro e as contagens de células totais encontram-se habitualmente acima dos 50 leucócitos por  $\mu\text{l}$  (Lowrie, Penderis, McLaughlin, Eckersall & Anderson 2009; Wamsley, 2014). Esta doença era antes denominada de vasculite necrotizante, síndrome da poliarterite juvenil, síndrome da dor do Beagle, síndrome da dor canina, meningite/meningomielite responsiva a corticosteroides e meningite supurativa asséptica (Lowrie *et al.*, 2009; Diogo & Camassa, 2013; Platt & Freeman, 2014).

Apesar de ser um diagnóstico mais comum em medicina humana do que em medicina veterinária, a presença de pleocitose neutrofílica deve levar o clínico a suspeitar de meningoencefalite/meningoencefalomielite bacteriana, ou menos frequentemente, fúngica (Marcos & Santos, 2011; Wood *et al.*, 2012; Wamsley, 2014). É de realçar que nem sempre são observados neutrófilos degenerados, devendo ser realizada uma cultura do LCR sempre que houver suspeita de infeção bacteriana (Wamsley, 2014). Contudo é mais provável encontrar neutrófilos degenerados associados a doenças infecciosas, como é uma meningite bacteriana, do que associados a doenças não infecciosas, como é o caso da meningite responsiva a corticosteroides (Wamsley, 2014; Dewey *et al.*, 2016). Para além de infeções bacterianas e fúngicas, também as infeções por riquetsias, parasitas e vírus (vírus da esgana) podem causar uma elevação do número de neutrófilos no LCR (De Lorenzi & Mandara, 2016; Moore & Barger, 2017).

Outras afeções que podem provocar um grau ligeiro a moderado deste tipo de pleocitose são os processos inflamatórios ativos resultantes de traumatismo, necrose, encefalite de origem desconhecida, hemorragia e embolismo fibrocartilágneo bem como de neoplasias, sendo o meningioma o mais referido na bibliografia (Chrisman 1992; Marcos & Santos, 2011; Wood *et al.*, 2012; Wamsley, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016;). Esta alteração também se verifica durante as 24 horas após a injeção com o meio de contraste da mielografia (Marcos & Santos, 2011; Wamsley, 2014).

A presença de pleocitose neutrofílica grave ou o aumento da contagem de neutrófilos em LCR colhidos sequencialmente têm sido associados a um prognóstico desfavorável (De Lorenzi & Mandara, 2016).

#### **5.3.2.4.3. Pleocitose eosinofílica**

Uma pleocitose é classificada como eosinofílica quando os eosinófilos correspondem a pelo menos 10 a 20% da população de células nucleadas (Cook & Levine, 2014). Em certas doenças como a meningoencefalite eosinofílica a percentagens de eosinófilos no LCR pode

ser bastante elevada, tendo sido registados valores entre 22 e 95%, com uma média de 78% (Windsor, Sturges, Vernau & Vernau, 2009).

Pleocitose eosinofílica é um achado raro (Wood *et al.*, 2012; Dewey *et al.*, 2016; De Lorenzi & Mandara, 2016), podendo estar associado a inflamações do SNC com predomínio de eosinófilos responsivas a esteroides (ex: meningite eosinofílica) (Wamsley, 2014). Esta é uma doença pouco comum associada a uma pleocitose grave e com mais de 80% de eosinófilos (Wamsley, 2014), parecendo estar sobrerrepresentada em Golden retrievers (Smith-Maxie, Parent, Rand, Wilcock & Norris, 1989). Outras causas desta pleocitose envolvem migrações parasitárias aberrantes, como *Angiostrongylus cantonensis* (Lunn *et al.*, 2012), vários agentes infecciosos, particularmente fungos (*Cryptococcus*) e protozoários como o *Toxoplasma* e o *Neosporora*, neoplasias e mais raramente, o vírus da esgana ou da raiva (Chrisman, 1992; Windsor *et al.*, 2009). Pode também ser provocada por afeções dos discos intervertebrais (Wood *et al.*, 2012). Wamsley (2014) adverte para a necessidade destas doenças serem excluídas antes de se iniciar terapia com glucocorticoides.

#### **5.3.2.4.4. Pleocitose mista**

Este tipo de pleocitoses caracteriza-se por um aumento do número de leucócitos onde nenhum tipo celular predomina, existindo uma população heterogénia de linfócitos, células monocitoides, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos ou plasmócitos (Marcos & Santos, 2011; Wood *et al.*, 2012). Esta mistura de células normalmente aponta para a transição de um processo inflamatório de agudo para crónico ou para um processo que se tem estendido no tempo, mas que continua ativo (Moore & Barger, 2017).

A pleocitose de células mistas pode ser observada numa grande variedade de afeções. Um exemplo típico são as causas inflamatórias, nomeadamente a MEG, na qual a contagem celular é frequentemente bastante elevada (Wood *et al.*, 2012). As meningites responsivas a esteroides devem também ser consideradas, apesar do seu aspeto citológico variável (Wamsley, 2014).

Outras afeções que podem causar esta pleocitose incluem infeções fúngicas, como criptococose, blastomicose e aspergilose, infeções por riquetsias como a erliquiose, com protozoários como a toxoplasmose e a neosporose, infeções bacterianas crónicas, infeções pelo vírus da esgana, traumatismo medular ou cerebral, isquemia e neoplasias (Chrisman, 1992; Marcos & Santos, 2011; Wamsley, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016; Kaewmongkol *et al.*, 2016).

Tipicamente, a maioria dos processos acima mencionados resultam numa pleocitose moderada a grave, podendo ser observada pleocitose ligeira em qualquer doença que resulte em enfarte ou mielomalacia do SNC, por exemplo situações agudas de hérnias discais (HD) (Chrisman, 1992; Wamsley, 2014). Por vezes, situações de hemorragia no interior do SNC ou

lesão na BHE podem originar uma pleocitose de células mista acompanhada por imagens de eritrofagocitose (Marcos & Santos, 2011).

#### **5.3.2.5. Outras alterações**

A observação de eritrofagocitose não indica a ocorrência de uma hemorragia iatrogénica, mas sim de uma hemorragia patológica, craniana ou espinhal (Wood *et al.*, 2012; De Lorenzi & Mandara, 2016). Nas lesões agudas os macrófagos contêm no seu interior eritrócitos, enquanto que nas hemorragias crónicas contêm hemossiderina (De Lorenzi & Mandara, 2016).

A presença de macrófagos no LCR não se restringe aos casos de hemorragia, representando a sua presença uma reação inespecífica à inflamação e à degeneração. Para além de células fagocitadas estes podem conter agentes infecciosos no seu interior. Como resultado de uma resposta inflamatória inespecífica, podem também ser observadas plasmócitos, estes são mais frequentemente encontradas nos casos de MEG, MEN ou outras doenças inflamatórias (Wood *et al.*, 2012).

A observação de células neoplásicas no LCR não é comum (Wood *et al.*, 2012). Contudo tal depende da localização da massa, ou seja, a sua proximidade aos ventrículos, comunicação com o espaço subaracnoideu e envolvimento meníngeo (De Lorenzi & Mandara, 2016). Podem ser observados tumores exfoliativos como linfoma, carcinoma de plexo coroide e histiocitose maligna (Vernau *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2012).

Na mielomalacia ou nas afeções desmielinizantes, como a mielopatia degenerativa pode ser observada mielina (Wood *et al.*, 2012, De Lorenzi & Mandara, 2016).

#### **5.4. Técnicas moleculares**

Atualmente utilizada em medicina veterinária de forma rotineira, a reação de polimerase em cadeia (PCR) é uma ferramenta útil de diagnóstico que permite, *in vitro*, detetar e amplificar exponencialmente pequenas amostras de ácido desoxirribonucleico (ADN) ou ácido ribonucleico (ARN) de agentes infecciosos, sendo particularmente útil quando não é possível a cultura destes agentes (Debiasi & Tyler, 2004; Di Terlizzi & Platt, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010).

Em casos de meningoencefalite de origem desconhecida, deve ser considerado o PCR do LCR para pesquisa de agentes patogénicos regionais. Este teste, juntamente com testes serológicos, irá maximizar as hipóteses de identificar o agente causador de doença (Nghiem & Schatzberg, 2010).

Apesar da grande utilidade do PCR na identificação de agentes a partir de pequenas quantidades de ADN e ARN, os seus resultados devem ser interpretados cautelosamente (Nghiem & Schatzberg, 2010). Um resultado negativo não exclui a presença do agente infeccioso a ser pesquisado (Di Terlizzi & Platt, 2009). Visto poderem ocorrer falsos negativos por diversas razões, nomeadamente o material genético do agente infeccioso no LCR existir em quantidades ínfimas tornando-o indetetável à técnica, o material genético esteja presente apenas no parênquima e não no LCR, ou ainda, se o agente que despoletou a doença já não se encontrar presente no LCR. Problemas com a extração dos ácidos nucleicos e a presença de inibidores de PCR na amostra, como a hemoglobina, podem também resultar em falsos negativos. Contudo estes são evitados com a realização de controlos positivos (Nghiem & Schatzberg, 2010). São também necessários controlos negativos para demonstrar a ausência de ADN contaminante nos reagentes de PCR, evitando assim falsos positivos (Evans, 2009). Para além do PCR convencional existem variações desta tecnologia, nomeadamente o PCR multiplex (mPCR), a transcriptase reversa do PCR (RT-PCR), o nested PCR (nPCR), o PCR em tempo real (qPCR), o degenerate PCR e o consensus PCR (Evans, 2009). Serão brevemente descritos apenas o PCR convencional, o RT-PCR e o qPCR.

A pesquisa da maioria dos agentes infecciosos é realizada utilizando o PCR convencional, tal inclui a pesquisa de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii*, *Bartonella spp.*, *Borrelia burgdorferi* (Di Terlizzi & Platt, 2009). O PCR convencional é constituído por várias fases distintas. Inicialmente, a partir de uma amostra biológica, neste caso o LCR, procede-se à extração do ADN do agente a pesquisar e do ADN do paciente. De seguida são adicionados reagentes ao ADN extraído, incluindo dois oligonucleótidos iniciadores da reação (primers), uma ADN polimerase e nucleótidos individuais. Esta mistura, ao ser repetidamente submetida a ciclos térmicos, entre 25 a 45 vezes, irá amplificar exponencialmente a sequência de ADN que apresenta interesse. Nos ciclos térmicos a mistura começa por ser aquecida a uma temperatura elevada desnaturando a cadeia dupla do ADN, separando-as em cadeias individuais. De seguida, a temperatura é reduzida de modo a promover o anelameneto de cada primer com ADN alvo e, por fim, a temperatura é novamente aumentada, mas apenas ligeiramente, de modo a que os nucleótidos se liguem a uma cadeia de ADN que se esteja a formar. A enzima polimerase irá promover a extensão dos primers que se irão ligar a estes nucleotídeos, produzindo uma nova cópia (Evans, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010). Após a amplificação é necessário identificar os produtos da reação. A técnica mais utilizada é a eletroforese em gel. Esta, ao separar os produtos do PCR por peso molecular, permite especificar o agente etiológico em pesquisa (Bartlett, 2003).

Para obter o material genético de um vírus com genoma ARN é necessário recorrer ao RT-PCR, como é o caso do *Morbillivirus*, o vírus da esgana (Saito *et al.*, 2006; Greene & Vandeveld, 2012). Neste PCR é necessário criar uma cadeia de ADN complementar a partir do ARN original do vírus. É a partir desta cadeia complementar que se procede à amplificação,

utilizando as mesmas técnicas que se utilizam no PCR convencional (Nghiem & Schatzberg, 2010).

Ao contrário do PCR convencional, que é essencialmente uma técnica qualitativa, o PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica quantitativa, permitindo a quantificação objetiva do ácido nucleico de interesse na amostra (Evans, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010). O qPCR é semelhante ao PCR convencional, residindo a diferença no facto do produto do PCR emitir fluorescência, fluorescência essa que pode ser quantificada em cada ciclo, através de um termociclador especializado. Esta técnica possui, em relação ao PCR convencional, a vantagem de eliminar as etapas pós-amplificação e, ao possuir marcadores fluorescentes, aumentar a sua sensibilidade, aproximando-se a sua eficácia dos 100% (Evans, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010).

Num estudo recente foi utilizado com sucesso o nPCR na pesquisa de *Neospora caninum* em cães assintomáticos, tendo os autores concluído que este é um método sensível e que o LCR é um dos tecidos mais infetados por este protozoário parasita (Pouramini, Jamshidi, Shayan, Ebrahimzadeh, Namavari & Shirian, 2017).

## **5.5. Outros Testes**

Atualmente estão disponíveis um número crescente de testes suplementares que podem ser realizados ao LCR (Wood *et al.*, 2012). Estes incluem a medição dos níveis de glucose, de albumina e imunoglobulinas, culturas de LCR, entre outros, alguns ainda a serem estudados (Di Terlizzi & Platt, 2009, De Lorenzi & Mandara, 2016). Serão aqui discutidos alguns destes testes.

As culturas bacterianas, aeróbias e anaeróbias, e os testes de sensibilidade aos antibióticos estão recomendados para todas as amostras de LCR em que sejam visualizados neutrófilos degenerados ou bactérias ao exame citológico (Radaelli & Platt, 2002; Cook & Levine, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016). Contudo, em medicina veterinária não são realizadas culturas rotineiramente. Tal deve-se ao elevado número de falsos negativos, justificados por fatores como um mau processamento da amostra e do meio de cultura, pela presença do agente em pequenas quantidades ou confinado ao parênquima cerebral, ou até devido ao paciente ter realizado antibioterapia previamente à colheita (Radaelli & Platt, 2002; Di Terlizzi & Platt, 2009; Wood *et al.*, 2012). Podem ainda ser realizadas culturas fúngicas e virais no LCR, mas têm vindo a ser substituídas por titulação de anticorpos e antígenos e por técnicas moleculares (Wood *et al.*, 2012).

Tal como referido anteriormente, um aumento do teor de proteínas no LCR. Pode dever-se a um aumento da permeabilidade da BHE, à produção intratecal de globulinas, ou a ambos. Como forma de fazer esta distinção a albumina e as globulinas do LCR e do soro podem ser medidas e calculado o coeficiente de albumina (QA) e o índice de imunoglobulinas G (IgG).



Um QA aumentado sugere uma quebra na BHE com passagem de proteínas do plasma para o LCR. Um índice IgG aumentado com um QA normal sugere produção intratecal de IgG. Já um aumento tanto no índice IgG como no QA aponta para uma quebra na BHE como fonte das IgG. Um índice IgG elevado pode indicar doença inflamatória. Contudo, não se pode excluir a hipótese de doença neoplásica. Podem ainda ser estudadas as percentagens das frações de globulinas, alfa, beta e gama-imunoglobulinas. As IgA, IgM e IgG podem também ser quantificadas através de testes ELISA, tendo a sua acumulação no LCR sido associada a afeções inflamatórias do SNC (Chrisman, 1992; Di Terlizzi & Platt, 2009; Nghiem & Schatzberg, 2010; Wood *et al.*, 2012; De Lorenzi & Mandara, 2016). A medição da IgA é particularmente útil quando existem suspeitas clínicas de MARE, havendo nestes pacientes uma maior concentração desta imunoglobulina no soro e no LCR (Tipold, 1995; Nghiem & Schatzberg, 2010; Maiolini, Carlson, Schwartz, Gandini & Tipold, 2012). Atualmente estão disponíveis uma grande variedade de testes de anticorpos e antígenos para a deteção de vírus, fungos, protozoários e rickettsias. A medição dos títulos de anticorpos no LCR pode ser mais fiável que no soro (Matsuki *et al.*, 2004). Tipicamente os títulos de anticorpos pesquisados em cães com doença do SNC incluem: *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Rickettsia rickettsi* e *Coccidioides immitis*. Todavia é importante frisar que os títulos de anticorpos refletem uma exposição direta do animal ao agente, a sua presença não confirma uma infeção ativa, pelo que o contexto clínico do paciente deve ser tido em conta (Nghiem & Schatzberg, 2010).

A concentração de glucose no LCR pode ser medida com um glucómetro normal. A sua concentração deve encontrar-se entre os 60 a 80% da concentração de glucose sanguínea, pelo que deve ser medida em paralelo com esta (Desnoyers *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2012). Contudo, esta relação pode depender de diversos fatores como os níveis de glicemia, a permeabilidade da BHE e a presença de células ou microrganismos glicolíticos (Wood *et al.*, 2012; De Lorenzi & Mandara, 2016). Níveis baixos de glucose no LCR são normalmente encontrados em infeções bacterianas do SNC em humanos. Porém, segundo um estudo realizado por Weber, Maiolini e Tipold (2012) a glucose do LCR não pode ser utilizada como marcador para diferenciar meningites bacterianas de outras afeções inflamatórias do SNC, uma vez que os baixos níveis de glucose parecem ser causados por um aumento na contagem celular e não pelo metabolismo bacteriano.

Atualmente a medição dos biomarcadores que se encontram no LCR constitui uma área em expansão. Estes biomarcadores mais não são que moléculas que podem indicar alterações fisiológicas e patológicas no SNC, mas cuja precisão diagnóstica depende da sensibilidade e especificidade (Cook & Levine, 2014; Nishida, 2014). Um desses biomarcadores é a creatina quinase. A atividade desta enzima, juntamente com um aumento da contagem de células nucleadas e da concentração proteica, está associada a um pior prognóstico em cães com HD. Outro biomarcador que parece ter valor como indicador independente de prognóstico em

cães também com HD toracolombar é a proteína básica da mielina (Levine *et al.*, 2010; Witsberger *et al.*, 2012; Levine & Levine, 2012; Cook & Levine, 2014). As matrizes metaloproteinases (MMPs) são enzimas proteolíticas. A expressão da MMP-9 no LCR está associada à gravidade dos sinais clínicos e prognóstico de cães com HD. A sua expressão, associada à ausência de sensibilidade profunda, é um indicador de mau prognóstico (Nagano, Kim, Tokunaga, Arai, Fujiki & Misumi, 2011). A MMP-9 foi ainda detetada no LCR de cães com tumores intracranianos, podendo a sua expressão ser um marcador útil na identificação e monitorização da resposta à terapêutica destas neoplasias (Mariani, Boozer, Braxton, Platt, Vernau, McDonnell & Guevar, 2013). Foi ainda detetado o aumento da MMP-9 em cães com leishmaniose visceral, pelo que se conclui que um aumento da MMP-9 no LCR sugere um estado inflamatório dentro do SNC, mas não fornece evidências específicas de que o processo é o resultado de uma doença específica (Nishida, 2014).

Existem ainda outras análises possíveis de se realizarem ao LCR para além dos testes referidos acima, como é o exemplo da citometria de fluxo, medição da proteína tau, do cálcio, do lactato, da aspartato aminotransferase, da proteína ácida fibrilar glial, de fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular e transformador beta, entre outros (Di Terlizzi & Platt, 2009; Witsberger *et al.*, 2012; Roerig, Carlson, Tipold & Stein, 2013; Nishida, 2014).

## **IV– Análise e interpretação de líquido cefalorraquidiano em cães na prática clínica – estudo retrospectivo de 130 casos**

### **1. Objetivos**

Com este trabalho espera-se conhecer a diversos níveis a população canina a que se colhe LCR, caracterizando a população de cães que é submetida a este procedimento num hospital veterinário de referência na área metropolitana de Lisboa. Com esta caracterização espera-se perceber quais os sinais clínicos que motivam os médicos veterinários a escolher realizar este exame complementar que envolve a execução de procedimentos invasivos. Espera-se caracterizar esta população também em relação às suas características intrínsecas, nomeadamente raça, sexo e idade com que são submetidos a este procedimento.

Outro objetivo deste trabalho consiste em perceber quais as diferentes alterações e suas frequências, encontradas na análise de LCR nos diferentes parâmetros, macroscópicos, quantitativos e citológicos, na amostra em estudo e, se estas coincidem com o que se encontra descrito na bibliografia até à data.

Espera-se também descobrir a importância dos agentes infecciosos como causa de doença neurológica, avaliando-se a sua prevalência nos cães da amostra que realizaram perfis neurológicos no LCR.

Procura-se igualmente neste trabalho perceber se existe alguma relação entre características intrínsecas aos pacientes e os resultados obtidos pela análise dos seus LCR.

Propõem-se ainda tentar perceber se tanto a análise citológica do LCR como as técnicas moleculares, através da realização de perfis neurológicos, possuem alguma utilidade como ferramenta de prognóstico, fornecendo informações quanto ao desfecho mais provável do episódio clínico.

Em suma, pretende-se obter um esclarecimento sobre a utilidade clínica do estudo do LCR, o enquadramento clínico em que é proposta a sua análise e as alterações mais frequentemente encontradas e o seu significado.

### **2. Material e métodos**

#### **2.1. População em estudo**

A amostra em estudo é constituída por 130 casos de cães com sintomatologia neurológica variada, cujo LCR foi colhido e sujeito a análise citológica. Estes animais apresentaram-se ao HVR, onde se procedeu à colheita do seu LCR, entre o dia 2 de janeiro de 2015 e o dia 19 de

maio de 2017. Foram admitidos no estudo pacientes do HVR ou referenciados de centros veterinários, sem restrição de raça, idade, sexo e estado reprodutivo.

A seleção dos casos foi realizada com recurso ao sistema informático QVET®, tendo sido pesquisadas e analisadas as fichas clínicas dos cães cujo LCR tinha sido colhido e analisado no período temporal acima mencionado.

A unidade experimental corresponde a uma colheita de LCR motivada por um episódio clínico de duração temporal variável. Deste modo, quando se procedeu à colheita do LCR de um animal mais do que uma vez, este animal aparece no estudo mais do que uma vez somente se a colheita de LCR não foi justificada pelo mesmo episódio clínico, como seria o caso de uma reavaliação.

## **2.2. Critérios de exclusão**

Foram excluídos os cães cujo LCR, apesar de ter sido colhido no HVR, não foi analisado pela responsável pelo serviço de patologia clínica deste Hospital, de forma a uniformizar esta análise e diminuir assim o erro inerente à variação de operadores. Foi ainda considerado critério de exclusão a ausência de uma ficha clínica completa que reportasse toda a informação referente à idade, ao sexo, à raça e aos sinais clínicos que motivaram o médico veterinário a tomar a decisão de se proceder à colheita de LCR.

Os casos em que os pacientes realizavam, à data da colheita da amostra de LCR, terapêutica com corticosteroides ou com antibióticos foram também excluídos deste estudo.

Devido às variações reportadas na bibliografia, respeitantes à análise quantitativa do LCR em diferentes pontos de colheita, os cães sujeitos à recolha de LCR via punção lombar, ao invés de punção na cisterna magna, foram excluídos deste estudo.

Nos casos de animais sujeitos a mais do que uma recolha de LCR motivadas pelo mesmo episódio clínico, apenas foi incluída a primeira colheita.

Os casos em que ocorreu contaminação da amostra com sangue durante a recolha foram também excluídos, não se recorrendo a fórmulas para calcular a contagem total de células nucleadas.

## **2.3. Protocolo e recolha de dados**

Os cães incluídos no estudo foram sujeitos a uma avaliação neurológica prévia à realização da colheita de LCR, avaliação essa realizada pelos clínicos do HVR ou realizada pelos médicos veterinários referentes, sendo que nesta última situação apesar das avaliações terem sido realizadas em outro centro veterinário, os pacientes apresentaram-se no HVR acompanhados com as informações referentes a esta avaliação. Relativamente às consultas de neurologia realizadas no HVR, estas foram realizadas pelos médicos veterinários que

constituem a equipa clínica do serviço de neurologia do HVR, podendo os pacientes serem seguidos habitualmente naquele hospital ou serem seguidos noutra centro veterinário e terem sido referenciados para o HVR para uma consulta de neurologia.

Para este estudo foram utilizadas as informações registadas nas fichas de historial clínico de cada paciente, referentes às características intrínsecas a cada um, aos sinais clínicos demonstrados durante o episódio clínico em estudo, episódio esse que motivou a análise de LCR de cada animal e nos casos em que foi possível, o desfecho do episódio clínico.

Foram também recolhidas informações referentes à análise do LCR, incluindo aqui os exames laboratoriais realizados no laboratório do HVR e as técnicas moleculares realizadas por laboratórios externos a 32 amostras de LCR.

## 2.4. Sinais clínicos

Durante as consultas de neurologia foram realizados a cada um dos pacientes um exame neurológico detalhado. Os dados relativos a esta avaliação, assim como os associados ao exame físico geral e outras informações pertinentes a cada caso foram registados na ficha clínica de cada animal pelo clínico que realizou a consulta. Como método de organização dos dados relativos aos sinais clínicos, estes foram agrupados de acordo com os vários componentes avaliados no exame neurológico e alguns do exame físico. Deste modo os sinais clínicos foram divididos em 13 grupos (tabela 5).

Tabela 5 - Sinais clínicos avaliados.

<b>Parte integrante de um exame neurológico</b>	Avaliação do estado mental e comportamento
	Postura e posição do corpo em descanso
	Marcha
	Nervos cranianos
	Reações posturais
	Reflexos espinhais
	Percepção sensorial/sensibilidade á dor
	Tónus muscular e tamanho dos músculos
	Trato urinário e respetiva função
	Manifestação de dor de coluna
	Presença de movimentos involuntários
	Presença de convulsões
<b>Parte integrante de um exame físico</b>	Hipertermia

Sobre cada componente do exame apenas foi registada a presença ou ausência de alterações, sem especificar a alteração em concreto.

## **2.5. Colheita de LCR**

Todas as amostras de LCR foram colhidas no HVR. As colheitas foram realizadas ao nível da cisterna magna, com os pacientes sob anestesia geral.

Durante todo o processo foram tomadas as medidas de assepsia recomendadas, como a tricotomia e desinfeção da área a puncionar, bem como a exclusiva utilização de materiais estéreis como as luvas cirúrgicas, agulhas e tubos de recolha da amostra. As amostras foram colhidas diretamente para uma seringa, sem a adição de qualquer substância, conforme as gotas se iam formando na extremidade do canhão da agulha.

## **2.6. Análise laboratorial**

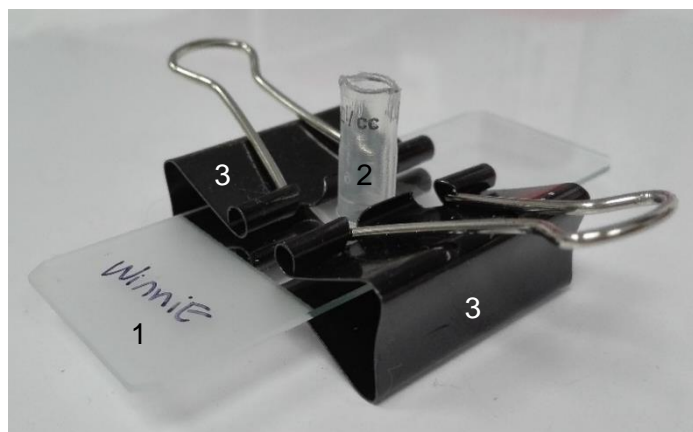
Após serem colhidas, as amostras de LCR seguiram diretamente para o laboratório do hospital, onde foram todas analisadas pela médica veterinária responsável por este laboratório. Todas as amostras foram processadas da mesma forma, sendo sempre seguido o mesmo protocolo com a mesma ordem de procedimentos laboratoriais. A análise realizada incluiu a avaliação macroscópica, a análise quantitativa e a avaliação microscópica das amostras de LCR.

O primeiro procedimento de processamento das amostras consistiu em preparar a câmara de Neubauer (hemocitómetro) para realizar a contagem celular diferencial. Para realizar esta avaliação as células do LCR necessitaram de ser coradas. Deste modo 100 µl de LCR foram aspirados por capilaridade para um tubo de micro-hematócrito e de seguida, separados por uma pequena bolha de ar, foi aspirado corante azul de metileno, ficando o tubo de micro-hematócrito com LCR numa extremidade, corante na outra e no meio a separar os dois líquidos, uma pequena bolha de ar. De seguida, o tubo foi levemente “embalado” com movimentos oscilatórios permitindo ao LCR entrar em contacto com as paredes que estiveram antes em contacto com o corante, ficando também o próprio LCR corado, sem, contudo, ser diluído, uma vez que a amostra continuou separada do corante pela bolha de ar durante todo o processo. Após este procedimento o tubo ficou a repousar durante 5 a 10 minutos, realizando-se depois o enchimento da câmara de Neubauer. A contagem celular foi realizada com recurso a um microscópio ótico, tendo sido contadas as células localizadas nos nove quadrados grandes de ambos os lados da câmara, fazendo-se depois a média com estes valores. Ao se multiplicar o valor obtido por 1,1 obtém-se o número de células/µl.

Como técnica de concentração para se proceder à avaliação citológica recorreu-se à técnica de sedimentação, aproveitando-se o tempo de repouso do tubo de micro-hematócrito para

montar o sistema de sedimentação (Figura 5). Cada um destes sistemas foi montado com recurso a uma lâmina, uma seringa de insulina Braun® (por ter as asas planas) e duas molas de papel. Primeiro cortou-se a seringa de insulina de forma a ficarem alguns centímetros da terminação do canhão da seringa. Com a ajuda de uma mola em cada asa da seringa, esta foi segura à lâmina. De modo a dar mais estabilidade ao sistema, o arame de baixo de cada mola foi retirado, podendo assim o sistema assentar sobre uma superfície plana sem oscilar. Após o sistema montado, 100  $\mu$ l de LCR foram depositados dentro da seringa cortada e aí repousaram aproximadamente durante 1 hora.

Figura 5 - Sistema de sedimentação e os seus componentes. (1) lâmina, (2) seringa de insulina cortada, (3) molas de papel sem os respetivos arames de baixo (fotografia original).



Passado o tempo de repouso do LCR no sistema de sedimentação (tempo este aproveitado para se proceder à contagem diferencial na câmara de Neubauer), o sobrenadante foi aspirado com uma seringa e uma agulha, ficando a lâmina a secar com o sistema ainda montado. Só após a lâmina secar é que o sistema era desmontado, indo posteriormente a lâmina para corar com Giemsa. Só após todos estes passos é que era possível proceder à avaliação citológica da amostra, sendo avaliados nesta fase os tipos celulares presentes, a sua morfologia, características de malignidade, a presença de bactérias ou outros microrganismos.

Nestas avaliações citológicas os tipos e graus de pleocitose foram definidos tendo como base os critérios referidos em Marcos e Santos (2011). Deste modo, os tipos de pleocitoses foram classificados como pleocitoses neutrofílicas, quando mais de 75% da população celular era constituída por neutrófilos, mononuclear, quando mais de 75% da população celular era constituída por células mononucleares ou mista, quando a população celular era heterogénea, não existindo um tipo celular que representasse mais de 70% da população. Quanto ao grau destas pleocitoses foram consideradas como pleocitoses ligeiras aquelas amostras que

possuíam entre 6 a 49 células nucleadas/ $\mu$ l, consideradas como pleocitoses moderadas aquelas que tinham entre 50 e 500 células nucleadas/ $\mu$ l e consideradas como pleocitoses graves as que possuíam mais de 500 células nucleadas/ $\mu$ l.

Durante os períodos de espera, como é o caso do tempo de secagem da lâmina para a avaliação microscópica, aproveitou-se e avaliaram-se os restantes parâmetros da análise quantitativa e realizou-se a avaliação macroscópica.

A avaliação macroscópica consistiu na avaliação visual da cor, podendo variar entre incolor até rosado/avermelhado se estiverem presentes eritrócitos. O aspeto da amostra foi também avaliado variando entre límpido e turvo.

Relativamente ao restante exame quantitativo, a medição da densidade da amostra foi realizada com recurso a um refratómetro. Já a medição das proteínas totais foi realizada com recurso às tiras reativas para análise de urina Uranotest 11C, colocando uma gota de LCR no quadrado relativo às proteínas e interpretando a mudança de cor após 1 minuto. Nestas tiras os resultados possíveis eram: negativo, vestígios (15 mg/dl), 1+ (30 mg/dl), 2+ (100 mg/dl), 3+ (300 mg/dl) e 4+ (1000 mg/dl).

Todas estas etapas permitiram à clínica interpretar e extrair conclusões sobre cada amostra, variando estas entre LCR sem alterações e amostras com diferentes tipos de pleocitoses.

## 2.7. Métodos moleculares

Após a realização de todas as análises no laboratório do hospital, 32 amostras de LCR foram enviadas para laboratórios externos, de modo a serem submetidas a técnicas moleculares para a pesquisa de agentes infecciosos. Estas amostras foram enviadas para os laboratórios no próprio dia em que foram colhidas, mantidas na seringa em que foram colhidas ou armazenadas em tubo seco, tendo sido mantidas até ao envio, em refrigeração.

As análises foram realizadas por 3 laboratórios diferentes, a Idexx®, a Vetinlab® e a Genevet®. Todos os laboratórios pesquisaram a presença de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia spp.* e o vírus da esgana canina. Contudo, a Vetinlab® e a Genevet® pesquisaram *Mycoplasma spp.* e a Idexx® não. Por outro lado, apenas a Idexx® pesquisou *Bartonella spp.*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* e *Cryptococcus neoformans*.

As técnicas de PCR utilizadas também diferiram entre laboratórios. Assim a Idexx® e a Vetinlab® realizaram PCR em tempo real para todos os agentes, enquanto que a Genevet® realizou PCR convencional para *Ehrlichia spp.*, *Toxoplasma gondii* e *Mycoplasma spp.*, nested PCR para *Neospora caninum* e transcriptase reversa do PCR para o vírus da esgana.

Na Genevet® foram realizados 17 perfis neurológicos, na Idexx® 12 e na Vetinlab® 3.



## **2.8. Análise estatística dos dados**

Os dados obtidos a partir das fichas clínicas dos pacientes foram analisados e posteriormente organizados com recurso ao programa Microsoft Office Excel 2010® (Microsoft Office 2010®) e a sua análise estatística realizada através do programa R® (versão 3.4.1.) e sua extensão R Commander.

Para cada parâmetro qualitativo são apresentadas as frequências absolutas e relativas, obtidas através dos softwares acima mencionados. Para avaliar a associação entre variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher, visto os valores esperados terem sido sempre menores de cinco. Foram considerados estatisticamente significativos apenas os valores de  $p < 0,05$ .

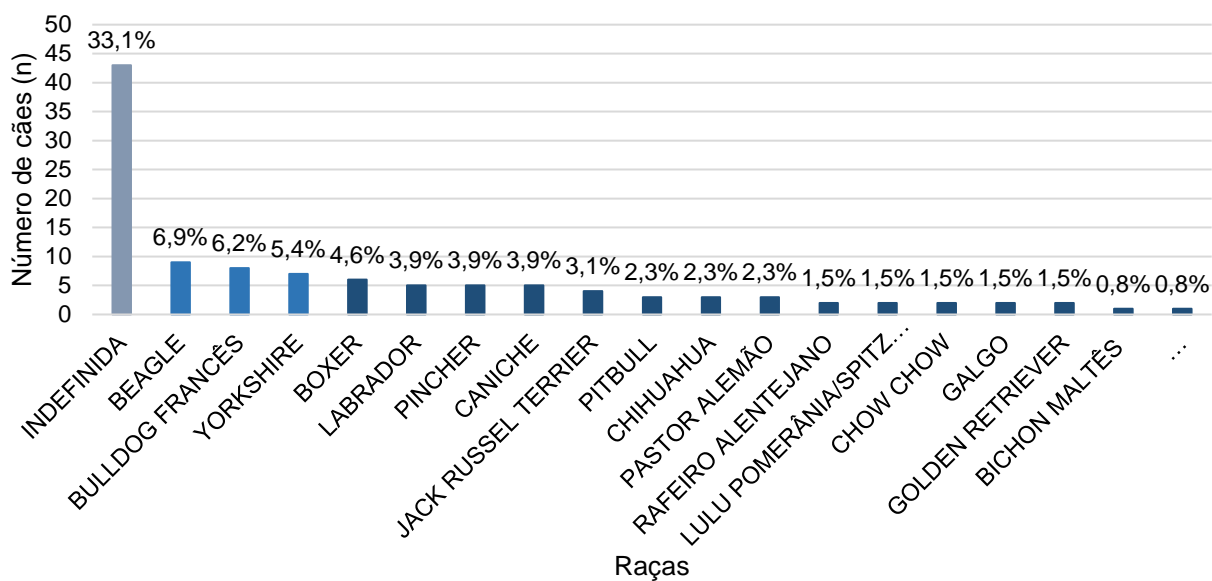
A descrição do parâmetro idade, o único parâmetro quantitativo, assenta nos valores máximo e mínimo, média e seu desvio padrão e mediana. Utilizou-se o teste one-way ANOVA para a comparação das médias dos diferentes resultados das citologias e dos perfis neurológicos.

## **3. Resultados**

### **3.1. Caracterização da amostra**

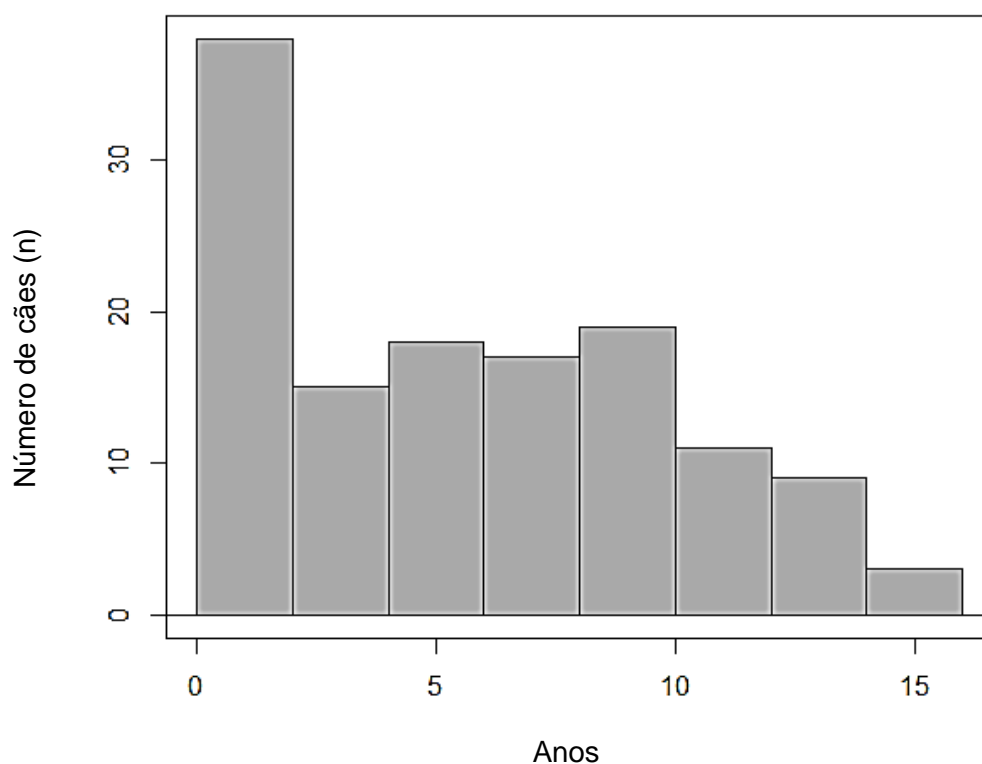
Tendo em conta os critérios mencionados, a amostra em estudo incluiu 130 ( $n=130$ ) cães cujo LCR foi colhido e sujeito a análise citológica. Da amostra total dos 130 animais, 75 (57,7%) eram machos e 55 (42,3%) fêmeas. Em relação às raças dos animais da amostra (Gráfico 1), 33,1% (43/130) eram de raça indefinida e os restantes 66,9% de uma raça pura, englobando um total de 35 raças diferentes, com os Beagle, os Bulldog Francês e os Yorkshire a terem maior expressão, respetivamente, 6,9% (9/130), 6,2% (8/130) e 5,4% (7/130). As restantes raças representaram individualmente menos de 5% da amostra (por ordem decrescente de frequência: Boxer, Labrador retriever, Pinscher, Caniche, Jack Russel terrier, American pit bull terrier, Chihuahua, Pastor alemão, Rafeiro Alentejano, Chow-chow, Galgo, Spitz alemão, Golden retriever, Bichon maltês, Shnauzer miniatura, Pug, Terra-nova, Boston terrier, Rottweiler, Perdigueiro Português, Podengo Português, Bulldog Inglês, Flat-coated retriever, Boiadeiro de Berna, Cão de Fila de São Miguel, Border collie, Épagneul breton, Shih-tzu, Dobermann, Pequinês, Ratonero bodeguero andaluz, Dogue alemão). Do total da amostra, 70% (91/130) dos animais foram referenciados para o HVR.

Gráfico 1 - Frequências absolutas e relativas das raças presentes na amostra



A idade mais baixa de toda a amostra corresponde a 3 meses e a mais alta a 15 anos e 4 meses. Sendo a média de idades aproximadamente 6 anos (5,98 anos  $\pm$  4,43) e a mediana igualmente 6 anos. O Gráfico 2 representa a distribuição das idades dos pacientes.

Gráfico 2 - Distribuição das idades dos cães da amostra



### 3.2. Sinais neurológicos

Os históricos clínicos de cada animal foram analisados e as alterações descritas pelos tutores e/ou descobertas durante o exame neurológico foram registradas nas fichas de cada paciente, estas alterações foram agrupadas com base nas várias fases constituintes da estrutura normal de um exame neurológico.

Apenas num dos grupos de sinais clínicos foram identificadas alterações em mais de metade da população em estudo. Este grupo de alterações ocorreu ao nível da marcha, tendo tido uma expressão de 58,5% (76/130) da amostra. A segunda alteração mais frequentemente identificada diz respeito à presença de dor de coluna, com 39,2% (51/130) dos pacientes a manifestarem esta queixa. Alterações registadas ao nível do estado mental e comportamento, dos nervos cranianos e a presença de convulsões foram registadas em igual número, estando cada um destes grupos de alterações presentes em 23,9% (31/130) dos pacientes. A frequência de alterações identificadas em 5 grupos de sinais clínicos compromete-se entre os 10 e os 20%.

Já as alterações menos frequentemente encontradas na amostra estão relacionadas, em ordem decrescente de frequência, com a perceção sensorial, com o tamanho e tonicidade muscular e ainda com o trato urinário. Foi apenas registado em cada um destes grupos de alterações, respetivamente, 7 (5,4%), 6 (4,6%) e 4 (3,1%) cães com alterações a estes níveis. Na tabela 6 encontra-se registado as frequências dos sinais clínicos encontrados na amostra em estudo.

Tabela 6 - Frequências absolutas e relativas dos sinais clínicos dos cães da amostra.

<b>Grupo de sinais clínicos</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa</b>
<b>Alterações da marcha</b>	76	58,5%
<b>Presença de dor de coluna</b>	51	39,2%
<b>Alterações do estado mental e comportamento</b>	31	23,9%
<b>Alterações dos nervos cranianos</b>	31	23,9%
<b>Presença de convulsões</b>	31	23,9%
<b>Alterações dos reflexos espinhais</b>	24	18,5%
<b>Alterações das reações posturais</b>	22	16,9%
<b>Alterações da postura</b>	21	16,2%
<b>Presença de movimentos involuntários</b>	18	13,9%
<b>Presença de hipertermia</b>	15	11,5%

Tabela 6 (continuação)

<b>Alteração da percepção sensorial</b>	7	5,4%
<b>Alterações musculares</b>	6	4,6%
<b>Alterações da função do trato urinário</b>	4	3,1%

### 3.3. Variáveis laboratoriais

#### 3.3.1. Avaliação Macroscópica

A maioria das amostras de LCR, cerca de 96,2% (125/130) eram incolores. As restantes 5 amostras, representando 3,9% do total das amostras, foram classificadas como tendo uma coloração rosada/vermelha. Nenhuma das amostras analisadas se apresentava xantocrômica.

Em relação ao parâmetro turvação, 92,3% (120/130) das amostras foram classificadas como sendo límpidas, 1,5% (2/130) como sendo ligeiramente turvas e 6,2% (8/130) como turvas.

#### 3.3.2. Análise Quantitativa

Na análise quantitativa incluem-se a contagem celular, a medição da densidade e a medição das proteínas, apesar do método utilizado para quantificar as proteínas ser considerado semiquantitativo.

A contagem de células nucleadas foi agrupada em 4 intervalos de células/ $\mu$ l, nomeadamente, contagens entre 0 e 5, entre 6 e 49, entre 50 e 500 e superiores a 500, correspondendo respetivamente a um LCR normal, a uma pleocitose ligeira, a uma pleocitose moderada e a uma pleocitose grave. Deste modo, 51,5% (67/130) das amostras possuíam um número de células considerado normal para o LCR, sem terem uma pleocitose. Cerca de 18,5% (24/130) possuía uma pleocitose ligeira e 30,0% (39/130) uma pleocitose moderada. A amostra com maior número de células nucleadas presente, possuía 340 células/ $\mu$ l.

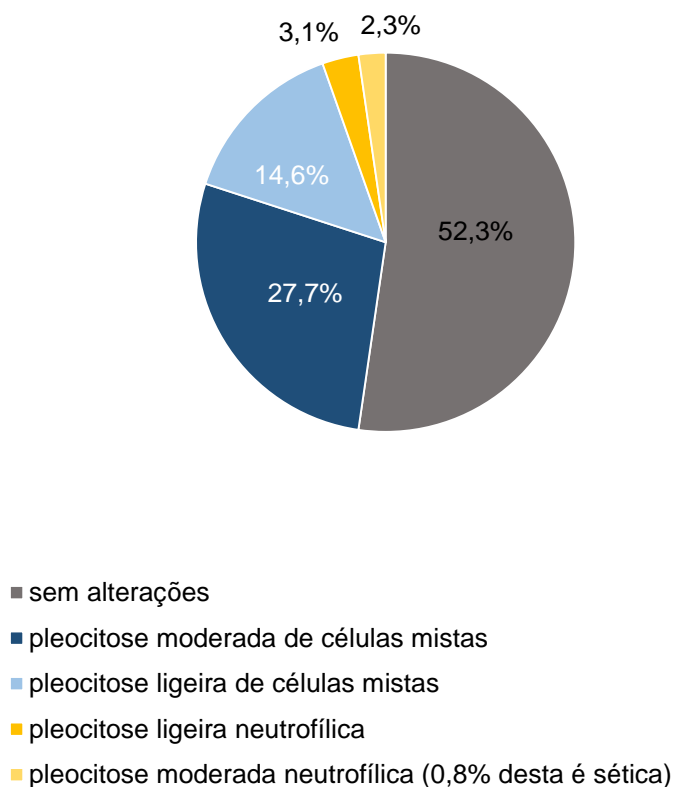
A densidade da maioria das amostras, 98,5% (128/130), encontrava-se entre 1004 e 1006. Apenas duas amostras apresentaram uma densidade aumentada, individualmente com 1008 e 1007, representando cada uma delas 0,8% do total avaliado.

Em relação ao teor de proteína, 46,2% (60/130) possuía menos de 30 mg/dl, ou seja, nas tiras reativas para análise de urina obteve-se negativo ou vestígios, 51,5% (67/130) cerca de 30 mg/dl, 1,5% (2/130) possuía 100 mg/dl e 0,8% (1/130) da amostra 300 mg/dl.

### 3.3.3. Avaliação Citológica

Das 130 citologias realizadas aos LCR, aproximadamente metade, cerca de 52,3% (68/130) não apresentavam alterações significativas (Gráfico 3). As restantes 62 amostras dividiram-se entre pleocitoses de células mistas, cerca de 42,3% (55/130), e neutrofílicas, cerca de 5,4% (7/130). Sendo ainda possível subdividir estas pleocitoses pelo nível de gravidade em ligeiras e moderadas, ou seja, pelo número total de células nucleadas presentes. Assim, 14,6% (19/130) das amostras apresentaram pleocitoses ligeiras de células mistas, 27,7% (36/130) pleocitoses moderadas de células mistas, 3,1% (4/130) eram pleocitoses neutrofílicas ligeiras, 2,3% (3/130) pleocitoses neutrofílicas moderadas e pertencendo a estas últimas, numa das amostras foi identificada a presença de bactérias, sendo assim classificada como pleocitose neutrofílica séptica e representando 0,8% da população total de amostras.

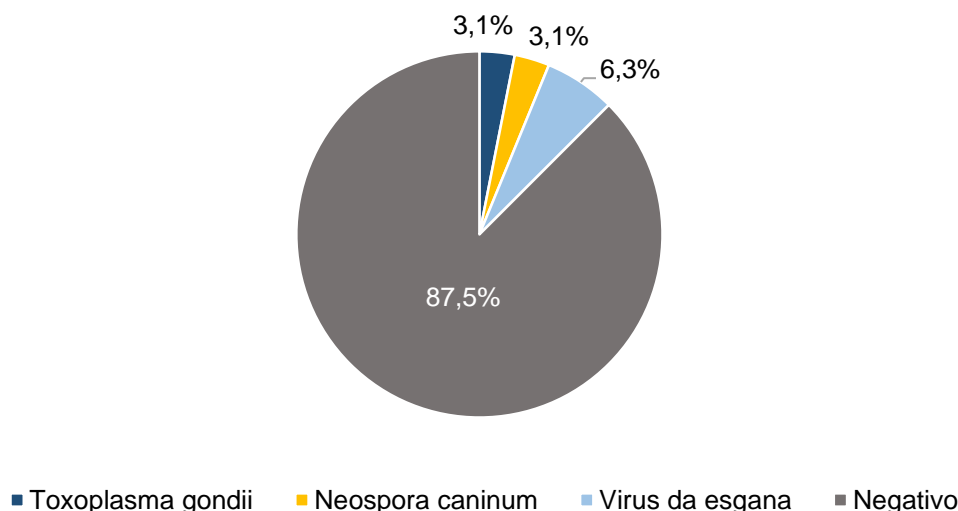
Gráfico 3 - Frequências relativas dos resultados da análise citológica dos LCR



### 3.4. Perfis Neurológicos

Das 32 amostras submetidas a técnicas moleculares, neste caso PCR, para a pesquisa de agentes infecciosos, em 28 delas, cerca de 87,5%, não foi detetado nenhum agente (Gráfico 4). Apenas nas amostras de LCR de 4 cães, ou seja, em 12,5% das amostras submetidas a estas técnicas, foram detetados agentes infecciosos. Numa das amostras foi detetado *Toxoplasma gondii* e noutra amostra foi detetado *Neospora caninum*, representando cada uma 3,1% do total das amostras sujeitadas a PCR. As restantes duas amostras deram positivo para a presença do vírus da esgana canina, representado este resultado 6,25% das amostras submetidas a esta técnica molecular. As amostras onde foi detetado o *Toxoplasma gondii* e a *Neospora caninum* foram analisadas no laboratório Genevet® e as amostras onde foi detetado o vírus da esgana foram analisadas no laboratório Idexx®.

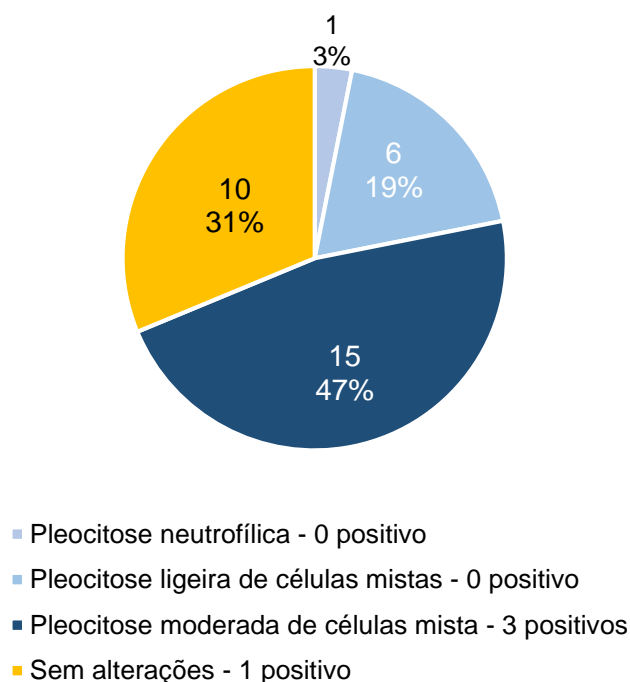
Gráfico 4 - Frequências relativas dos resultados do PCR



Das 32 amostras sujeitas às técnicas moleculares, em 22 delas tinham sido identificadas pleocitoses na avaliação citológica. É a este grupo que pertencem 3 das amostras positivas à técnica PCR, tendo as 3 amostras pleocitoses moderadas de células mistas (Gráfico 5). Nestas amostras foram identificados dois agentes infecciosos, nomeadamente, uma amostra positiva a *Toxoplasma gondii* (analisada pelo laboratório Genevet®) e duas amostras positivas ao vírus da esgana canina (ambas analisadas pelo laboratório Idexx®).

As restantes 10 amostras também sujeitas a estas técnicas não continham qualquer alteração digna de registo na avaliação macroscópica, análise quantitativa e avaliação citológica, ou seja, cerca de 31% dos perfis neurológicos foram realizados a LCR sem alterações. É neste grupo que se insere a amostra onde foi detetado *Neospora caninum*, tendo esta sido analisada pelo laboratório Genevet®.

Gráfico 53 - Distribuição dos perfis neurológicos pelos resultados citológicos



### 3.5. Desfecho do episódio clínico

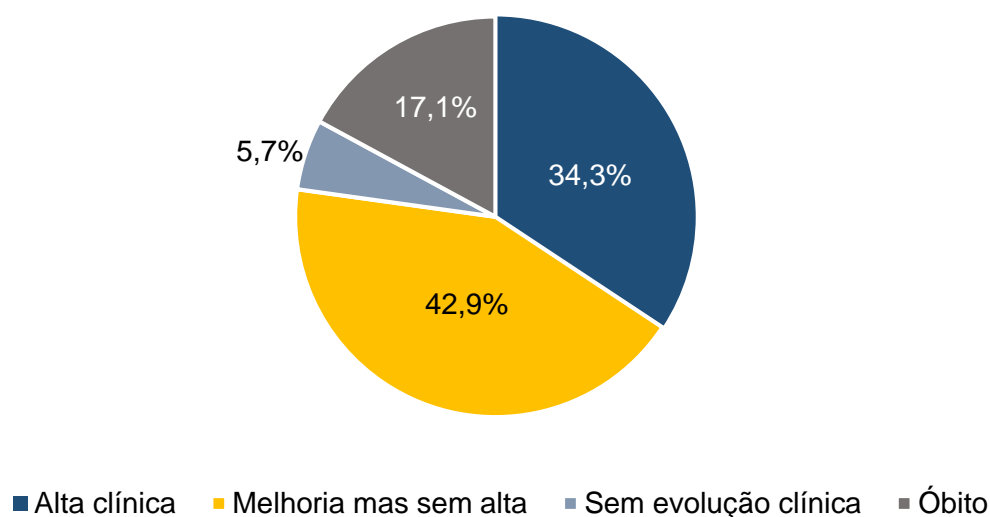
Devido ao elevado número de pacientes referenciados para o HVR para se proceder à colheita e análise do seu LCR, mas que continuaram a ser medicamente acompanhados pelos profissionais de outros centros veterinários, é também elevado o número de pacientes cujo desfecho do episódio clínico em estudo se desconhece. Dos 130 animais que constituem a amostra, apenas se conhece o que sucedeu a 54 deles. Estando incluídos nestes 54 animais, pacientes, com ou sem alterações detetadas nas amostras dos seus LCR e com ou sem agente infeccioso identificado por PCR.

Do grupo dos 62 animais cujos LCR apresentaram alterações, apenas se conhece a história clínica após colheita e análise da amostra de 35 deles. Destes 35 pacientes cuja história e desfecho clínico é conhecido, 34,3% (12/35) obtiveram a cura e consequente alta clínica referente ao problema neurológico em questão (Gráfico 6). Em 5,7% (2/35) dos animais o quadro clínico manteve-se inalterado. Até à data da consulta das fichas clínicas dos animais em estudo, cerca de 42,9% (15/35) dos pacientes tinham obtido uma melhoria dos sinais clínicos, sem, ainda assim, obterem alta clínica, estando, portanto, até aí ainda a fazer tratamento. Destes últimos animais que apresentaram melhorias clínicas, em quase metade deles, cerca de 7 dos 15 que melhoraram, mas sem alta clínica, ocorreram recaídas clínicas, relacionadas ou não com a descontinuação da terapêutica com alguns fármacos,

nomeadamente corticosteroides. Estes animais que estando a melhorar tiveram uma recaída representam, no total de animais com alterações no LCR, 20% dos pacientes.

Nem todos os animais sobreviveram à doença neurológica que os acometeu. 17,1% (6/35) dos cães com alterações no LCR acabaram por morrer. Metade destes, 3, como consequência indireta da doença causadora dos sinais clínicos, uma vez que os donos optaram pela não realização e/ou prolongamento do tratamento, ou seja, pela eutanásia. A causa da morte da outra metade estará provavelmente relacionada com a doença neurológica que os acometia, sem, contudo, terem sido realizados exames histopatológicos para o confirmar.

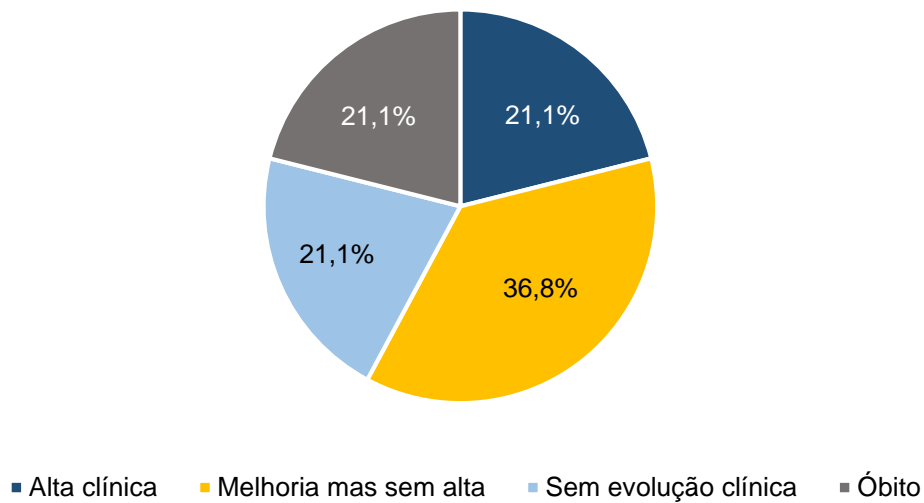
Gráfico 64 - Distribuição dos desfechos clínicos em cães com alterações no LCR



Dos 54 desfechos clínicos conhecidos, 19 dizem respeito a animais cujos LCR se apresentavam normais. Nestes animais o número de altas clínicas, mortes e quadros clínicos que permaneceram iguais foi o mesmo, tendo cada um destes desfechos ocorrido individualmente a 4 cães (21,1%) (Gráfico 7). Tal como sucedeu aos cães com LCR alterados, o desfecho mais registado foi a melhoria clínica, mas sem alta, este desfecho ocorreu em 7 pacientes (36,8%).



Gráfico 75 - Distribuição dos desfechos clínicos nos cães sem alterações no LCR



### 3.6. Associação entre variáveis

#### 3.6.1. A análise de LCR como ferramenta de prognóstico

De forma a se estudar a utilidade dos resultados obtidos pela análise do LCR como ferramenta de prognóstico, a relação entre a variável desfecho e as variáveis resultados da citologia do LCR e resultados dos perfis neurológicos foi analisada.

Para efeitos estatísticos, os diferentes desfechos clínicos conhecidos, ou seja, os 54 casos obtidos após a exclusão daqueles cujos desfechos são desconhecidos, foram agrupados em dois grupos. Um grupo constituído pelos pacientes que melhoraram, representando este grupo 70,4% (38/54) da população em amostra, sendo aqui incluídos os que obtiveram alta clínica e os que melhoraram, mas não obtiveram alta clínica, permanecendo à data da recolha de dados a fazer tratamento. O outro grupo constituído pelos pacientes que não obtiveram qualquer melhoria clínica, representando 29,6% (16/54) da amostra, fazendo parte deste grupo os pacientes que mantiveram os mesmos sinais clínicos e os que morreram. Na tabela 7 encontram-se os diferentes desfechos clínicos, mais pormenorizadamente, separados pelos diferentes resultados da análise citológica do LCR, na tabela 8 encontra-se o mesmo, mas em função dos resultados do PCR ao LCR.

Tabela 7 - Relação entre desfechos clínicos e resultados da análise do LCR

<b>Desfecho</b>	<b>LCR</b>		
	Pleocitose de células mistas	Pleocitose neutrofílica	Sem alterações
<b>Alta clínica</b>	12 (75,0%)	0 (0%)	4 (25,0%)
<b>Melhorou, mas sem alta clínica</b>	12 (54,5%)	3 (13,6%)	7 (31,8%)
<b>Sem evolução clínica</b>	2 (33,3%)	0 (0%)	4 (66,7%)
<b>Óbito</b>	6 (60,0%)	0 (0%)	4 (40,0%)

A relação entre o resultado da citologia do LCR e o desfecho não é estatisticamente significativa. No entanto, é de notar o facto de que os 3 pacientes com pleocitose neutrofílica melhoraram, mas permaneceram a fazer tratamento crónico e ainda o facto de que dos 16 pacientes que tiveram alta clínica, 12 apresentavam uma pleocitose de células mistas, representando 75% dos animais com este desfecho.

Tabela 8 - Relação entre desfechos clínicos e resultados do PCR do LCR.

<b>Desfecho</b>	<b>PCR</b>	
	negativo	positivo
<b>Alta clínica</b>	8 (100%)	0 (0%)
<b>Melhorou, mas sem alta clínica</b>	6 (60,0%)	4 (40,0%)
<b>Sem evolução clínica</b>	3 (100%)	0 (0%)
<b>Óbito</b>	0 (0%)	0 (0%)

Nenhum dos animais com um agente infeccioso identificado por PCR teve alta clínica, porém, todos os animais (4) com resultado positivo nesta técnica, melhoraram, mas permaneceram a fazer tratamento crónico. Contudo, a relação entre a identificação de um agente infecciosos e o desfecho não é estatisticamente significativa.

### 3.6.2. Raças e Pleocitoses

A amostra foi dividida entre cães de raça Beagle e cães sem serem de raça Beagle de modo a permitir a análise estatística entre esta variável e a variável resultados da citologia do LCR. Uma vez que os resultados espectáveis eram menores que 5 foi realizado o teste exato de Fisher. Neste teste obteve-se um valor de  $p = 0,003$ , sendo que  $p$  é menor que 0,05 a hipótese nula é rejeitada, ou seja, afirma-se com um intervalo de confiança de 95% que existe uma associação entre a raça do paciente e o resultado da análise citológica do LCR, nomeadamente entre cães de raça Beagle e LCR com pleocitose neutrofílica. Na tabela 9, encontra-se a distribuição dos cães da amostra, divididos segundo a raça, como Beagles ou não Beagles, pelos resultados obtidos na análise citológica dos seus LCR.

Tabela 9 - Distribuição de cães Beagle e não Beagle pelas citologias de LCR

Citologia do LCR			
Raça	Pleocitose de células mistas	Pleocitose neutrofílica	Sem alterações
Beagle	1 (11,1%)	3 (33,3%)	5 (55,6%)
Não Beagle	54 (44,6%)	4 (3,3%)	63 (52,1%)

Foram realizados testes one-way ANOVA comparando as médias das idades entre os vários resultados das citologias e dos PCR, contudo não existem diferenças estatisticamente significativas.

## 4. Discussão

### 4.1. Critérios de exclusão e inclusão

A amostra de 130 animais deste estudo foi obtida após se aplicarem determinados critérios de seleção que serão aqui de seguida explicados. Um dos critérios aplicados foi a de apenas incluir cães cujas histórias clínicas, nomeadamente os sinais clínicos que justificaram a colheita de LCR, eram conhecidas, podendo deste modo a amostra ser caracterizada não só quanto ao sexo, idade e raça, mas também quanto aos sinais neurológicos que apresentavam. Normalmente a concentração de proteínas é mais elevada na cisterna lombar do que na cisterna magna. Já com as contagens celulares ocorre o inverso, estas são ligeiramente mais

elevadas na cisterna magna (De Lorenzi & Mandara, 2016). Com base nesta informação optou-se por excluir também deste trabalho as amostras colhidas ao nível da cisterna lombar, de modo a se poderem comparar as amostras umas com as outras, uma vez que tal permite a utilização dos mesmos critérios na avaliação dos parâmetros quantitativos, para todas as amostras.

Todas as amostras incluídas neste estudo foram analisadas laboratorialmente pelo mesmo operador, eliminando deste modo os erros associados à variação de critérios de avaliação entre os vários executantes e às diferentes técnicas utilizadas, uniformizando os resultados ao serem seguidos os mesmos padrões de avaliação.

A contaminação com sangue provoca alterações na contagem celular e na concentração proteica das amostras de LCR (Wood *et al.*, 2012). Como tal, as amostras que macroscopicamente apresentaram alterações na coloração e cuja avaliação citológica não evidenciou eritrofagocitose, sendo resultado de contaminação com sangue durante a sua colheita, foram excluídas deste trabalho, não se recorrendo à utilização de fórmulas de correção devido à falta de precisão e confiança a si associadas (Wilson & Stevens, 1977; Sweeney & Russell, 2000).

Os cães que à época da colheita de LCR realizavam corticoterapia ou antibioterapia, foram também excluídos deste trabalho, uma vez que a administração destes fármacos, ao diminuir a migração de células inflamatórias (polimorfonucleares, monócitos e linfócitos) para os locais de lesão, provocam uma diminuição artificial da contagem de leucócitos (Pereira *et al.*, 2007; Wamsley, 2014) pondo em causa a fiabilidade dos resultados destas amostras.

#### **4.2. Caracterização da amostra**

Após serem aplicados todos os critérios acima detalhados, obteve-se uma amostra populacional constituída por 130 cães, composta por 42,3% fêmeas e 57,7% machos, todos eles sujeitos à respetiva análise de LCR e apresentando diferentes sinais clínicos neurológicos. Relativamente ao género, não se verificou uma diferença estatisticamente significativa entre os dois géneros. O mesmo ocorre no estudo realizado por Breu *et al.* (2015) onde foram analisadas amostras de LCR de 210 cães com sinais neurológicos, 35,3% desta amostra eram fêmeas e 58,5% machos, o género dos restantes 6,2% não foi identificado.

O espectro de idades de amostra é bastante largo, tendo o cão mais novo 3 meses e o cão mais velho 15 anos e 4 meses, com uma média de 6 anos. Este amplo intervalo de idades ocorre igualmente na amostra do estudo de Breu *et al.* (2015), variando nesse trabalho, dos 6 meses aos 14 anos de idade. Já a média de idades dessa amostra é 2 anos mais baixa, ou seja, de 4 anos.

Relativamente às raças dos animais da amostra, 33,1% dos cães não eram de raça pura, os restantes 66,9% distribuíram-se por 35 raças, sendo as mais frequentes a raça Beagle,

Bulldog Francês e Yorkshire. Já no estudo realizado por Breu *et al.* (2015) as raças mais frequentes foram as Chiuauas, Labradores retrievers, Boiadeiro de Berna e Boxers. Tal discrepância pode estar associada à diferente população canina em cada país e não ao facto destas raças estarem predispostas para doenças neurológicas.

Os animais aqui estudados foram submetidos a anestesia geral para a colheita de uma amostra do seu LCR, para a mesma ser posteriormente analisada. Uma vez que este procedimento é invasivo e acarreta alguns riscos, como por exemplo, o de ocorrer punção inadvertida do parênquima medular com a agulha (Taylor, 2016; Rossmeist, 2017) ou a herniação dos tecidos nervosos (Mohammad-Zadeh & Sisson, 2005; Wood *et al.*, 2012), a decisão dos clínicos em submeter os pacientes a este procedimento necessita de ser fundamentada na utilidade da informação que esta análise poderá fornecer, quer para o estabelecimento de um diagnóstico, quer para a monitorização e avaliação da eficácia de uma determinada terapêutica instituída. Como tal, durante as consultas foram recolhidas informações quanto à história e sinais clínicos dos pacientes e foram realizados o exame de estado físico geral e o exame neurológico. As informações recolhidas no exame neurológico têm o objetivo de determinar a área do sistema nervoso afetado, e a partir daí formular os possíveis diagnósticos diferenciais (Nye & Troxel, 2017).

Assim, numa tentativa de compreender os motivos pelos quais os clínicos optaram por esta análise, procedeu-se à recolha de dados das fichas clínicas dos pacientes, nomeadamente as alterações registadas tanto referentes ao exame físico como ao neurológico relativos ao episódio clínico associado à colheita do LCR. Após a análise destes dados foi possível verificar que mais de metade da amostra, cerca de 58,5%, apresentava alterações na marcha, tendo sido a alteração mais frequente entre estes animais. O segundo sinal mais frequente foi a presença de dor de coluna, que ocorreu em 39,2% da amostra. Os seguintes sinais clínicos mais frequentes, foram as alterações do estado mental e/ou comportamento, ocorrência de convulsões e alterações dos nervos cranianos, apresentando os três, separadamente, a mesma frequência na amostra, cerca de 23,9%.

Devido ao défice de informação disponível relativa aos sinais clínicos manifestados pelos cães a que se analisa o LCR, apenas é possível comparar os resultados obtidos com os referidos no estudo de Hugo, Heading e Labuc (2014). Contudo o trabalho referido apenas inclui 45 cães com alterações no LCR, ao contrário do presente trabalho que inclui também os animais cujo LCR se revelou normal, para além do modo de organização da informação relativa aos sinais clínicos diferir nos dois trabalhos. Dito isto, no estudo de Hugo *et al.* (2014) os cinco sinais clínicos mais encontrados foram, por ordem decrescente, ataxia (40%), convulsões (36%), cabeça inclinada (33%), alterações nas reações posturais (31%) e andar em círculos (27%).

### 4.3. Análise do LCR

São várias as doenças que podem provocar uma inflamação primária do SNC, podendo, portanto, serem responsáveis pela ocorrência de uma pleocitose. Tal é o caso das doenças infecciosas causadas por agentes como bactérias, vírus, protozoários, entre outros, doenças imunomediadas, ou até inflamações de etiologia desconhecida. Para além da inflamação diretamente causada pelo agente etiológico no SNC, pode igualmente ocorrer inflamação resultante de um processo secundário a outra causa, como traumatismos, neoplasias, entre outras (Hugo *et al.*, 2014). Como tal, comparando a grande variedade de doenças neurológicas às possíveis alterações encontradas no LCR, estas são relativamente limitadas, podendo inclusive o LCR não se apresentar alterado na presença de doença neurológica. Porém ocasionalmente a sua análise ajuda a fornecer um diagnóstico específico (Tipold, 1995; Vernau *et al.*, 2008).

Tendo em conta o referido a cima, era espectável que parte da amostra, apesar de demonstrar sinais clínicos de disfunção do sistema nervoso, não apresentasse alterações do LCR, o que de facto ocorreu em 52,3% (68/130) da população estudada. Não é do conhecimento da autora a existência de outros estudos publicados realizados nos mesmos moldes que o presente trabalho e com um tamanho de amostra semelhante, tornando a comparação dos resultados obtidos na análise citológica difícil. Existem, contudo, dois estudos, Bohn, Wills, West, Tucker e Bagley (2006) e Hugo *et al.* (2014), que comparam os dados obtidos pela análise de LCR com os obtidos através de RM, em animais com alterações neurológicas. Em ambos os estudos as amostras caracterizam-se por terem realizado os dois exames, o que as diferencia da atual amostra visto apenas ser exigido a esta a realização de análise ao LCR, podendo ou não ter sido realizados exames imagiológicos complementares. Dito isto, num desses estudos, Bohn *et al.* (2006), de uma amostra de 256 cães, apenas 72 animais (28,1%) apresentaram alterações no LCR, ou seja 71,9% dessa amostra apresentou um LCR sem alterações dignas de registo. É importante, todavia, ter em conta que desta amostra não foram excluídos os animais que realizavam corticoterapia na altura da colheita de LCR, o que provavelmente acrescentou erroneamente animais ao grupo dos que não apresentavam alterações no LCR.

Nos restantes 62 cães do presente estudo, os que apresentaram alterações na citologia de LCR, foram encontrados dois tipos de pleocitoses. A pleocitose de células mistas esteve presente em 55 cães (42,3%), quase oito vezes mais frequente que a pleocitose neutrofílica, apenas presente em 7 cães (5,4%). Os dois grupos foram subdivididos conforme o seu grau de gravidade, ou seja, consoante o número total de células nucleadas presentes, tendo sido classificadas como pleocitoses ligeiras as amostras que continham entre 6 e 49 células nucleadas/ $\mu$ l, como moderadas as que continham entre 50 e 500 células nucleadas/ $\mu$ l e como graves as que continham mais de 500 células nucleadas/ $\mu$ l. Utilizando esta subdivisão, das

pleocitoses de células mistas, 34,5% eram ligeiras e 65,5% moderadas. Já nas pleocitoses neutrofílicas, 57,1% eram ligeiras e 42,9% moderadas, não tendo sido observadas pleocitoses graves.

Segundo a bibliografia, os 42,3% de cães com pleocitoses de células mistas estariam a transitar de um processo inflamatório agudo para um crónico (Moore & Barger, 2017). Um exemplo típico das doenças idiopáticas inflamatórias ou degenerativas associadas a este tipo de pleocitose é a meningoencefalite granulomatosa (Wood et al., 2012; De Lorenzi & Mandara, 2016). Contudo, outras doenças podem estar subjacentes a esta pleocitose, como por exemplo as infeções bacterianas crónicas, fúngicas ou provocadas por protozoários (Chrisman, 1992; Marcos & Santos, 2011; De Lorenzi & Mandara, 2016). Já as pleocitoses neutrofílicas, que ocorreram em 5,4% de cães, seriam provocadas por processos inflamatórios agudos (Moore & Barger, 2017). Podendo este tipo de pleocitose ser provocado por um grande número de processos inflamatórios, sendo uma das doenças mais comuns a meningite-arterite responsiva a corticosteroides (MARE) (Wamsley, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016). É necessário ter também em conta que as infeções bacterianas, os processos inflamatórios ativos como o provocado por um traumatismo, qualquer doença que provoque uma área de necrose e outras doenças podem igualmente levar a este tipo de alteração no LCR (Chrisman 1992; Marcos & Santos, 2011; Wood et al., 2012; Wamsley, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016).

O facto de o tipo de pleocitose mais frequente ser o de células mistas vai ao encontro do descrito por Bohn *et al.* (2006). Porém no estudo referido as pleocitoses neutrofílicas tiveram uma relevância menor (5/256), tendo sido o terceiro tipo de pleocitose mais frequente, visto que neste estudo foram ainda identificadas pleocitoses linfocíticas e mononucleares, classificadas como dois tipos diferentes de pleocitose. Já no presente estudo, ao contrário do espectável, estes últimos tipos de pleocitoses não foram identificados, em particular a pleocitose linfocítica, que no estudo de Bohn *et al.* (2006) foi o segundo tipo de pleocitose mais frequente, 27 cães numa amostra total de 256.

No estudo realizado por Hugo *et al.* (2014) a amostra apenas inclui 45 cães cujo LCR estava alterado, tendo sido excluídas as amostras em que não estava disponível o tipo celular predominante, o que impossibilita uma comparação exata com todos os tipos de pleocitoses obtidos. É também necessário ter em conta que os critérios de inclusão diferem dos do presente estudo, tendo sido incluídas as amostras de LCR contaminadas com sangue e, ajustado o valor da contagem de células nucleadas subtraindo-se uma célula nucleada por cada 500 eritrócitos presentes. Dito isto, também nesse estudo foram identificadas pleocitoses de células mononucleares, mais especificamente, monocitoides (20/45) e linfocíticas (11/45). A ausência de pleocitoses mononucleares no presente estudo contraria o observado nos estudos atrás referidos, bem como Dewey *et al.* (2016) que descrevem a pleocitose

mononuclear como a mais comumente encontrada e Fry *et al.* (2006) que descrevem, segundo as suas experiências, como sendo mais observada que a neutrofílica.

Hugo *et al.* (2014) apenas referem que a classificação das pleocitoses foi efetuada com base no tipo de célula predominante, enquanto que Bohn *et al.* (2006) aclaram no seu estudo que o tipo de pleocitoses foi determinado quando mais de 85% da contagem celular correspondia a um tipo de células. Já no presente estudo o limite utilizado era mais baixo, 75%, sendo assim classificados como pleocitoses mononucleares as amostras com mais de 75% da contagem celular correspondente a células mononucleares.

Tipicamente as pleocitoses mononucleares encontram-se associadas a infeções virais (Marcos & Santos, 2011; Wood *et al.*, 2012; Wamsley, 2014), pelo que a ausência de pleocitoses mononucleares poderia indicar também a ausência de vírus nas amostras, o que de facto não ocorreu, tendo o vírus da esgana sido detetado via PCR em duas amostras. Em ambas foram identificadas pleocitoses moderadas de células mistas, tendo uma delas apresentado uma elevação das proteínas totais (PT) e densidade, respetivamente, 300 mg/dl e 1008, e a outra apresentado valores dentro dos limites normais. As pleocitoses de células mistas podem ser vistas numa variedade de doenças que incluem a esgana (De Lorenzi & Mandara, 2016), no entanto, a encefalomielite provocada pelo vírus da esgana canina é tipicamente caracterizada por pleocitoses com predomínio de linfócitos (Greene & Vandeveld, 2012; De Lorenzi & Mandara, 2016).

Já por outro lado a não identificação de pleocitoses eosinofílicas não é surpreendente. Levine e Levine (2012) descreveram não ser comum encontrar-se este tipo de pleocitose e nos trabalhos de Hugo *et al.* (2014) e Almeida (2013), respetivamente com 45 e 26 mostras de LCR alterado, não foi identificada nenhuma amostra com pleocitose eosinofílica.

Num dos LCR com pleocitose neutrofílica, os neutrófilos identificados apresentavam-se moderadamente degenerados, tendo também sido observadas bactérias. Esta amostra, de uma meningite bacteriana, representa menos de 1% da população total em estudo. Tal vai ao encontro da bibliografia, que aponta o diagnóstico de meningites bacterianas em cães como raro (Rusbridge, 1997; Glaus 2010). Infelizmente, por motivos financeiros, não foi enviada a respetiva amostra de LCR para cultura bacteriana, pelo que não foi identificada a população bacteriana presente.

Uma das pleocitoses moderadas de células mistas pertencia ao paciente com *Toxoplasma gondii*. Este tipo de pleocitose vai de encontro ao que a bibliografia descreve concernente aos animais infetados com este protozoário (Dubey & Lappin, 2012; Muñana, 2014; De Lorenzi & Mandara, 2016).

Relativamente aos parâmetros densidade e PT é de realçar que apenas três amostras apresentaram alterações, todas com PT aumentadas, duas delas com 100 mg/dl e a outra com 300 mg/dl. Uma das amostras com 100 mg/dl e a amostra com PT mais elevada apresentaram ainda um aumento da densidade, respetivamente 1007 e 1008. As três



amostras em questão apresentaram todas uma pleocitose moderada de células mistas, correspondendo a amostra com os valores mais elevados a um dos cães com o vírus da esgana, já anteriormente referido. Estes dados levam a questionar o estudo destes parâmetros no LCR, visto que fornecem muita pouca informação comparativamente com a avaliação citológica. Os valores das PT podem ser justificados pela ocorrência de falsos negativos na interpretação dos valores até 1+ (30 mg/dl) (Di Terlizzi & Platt, 2009). Já em 1988 Cook e DeNicola referiam que a medição da densidade através de um simples refratômetro não possui muito valor, por apenas detetar alterações quando o aumento das proteínas totais é muito acentuado nas amostras. Estas afirmações vão de encontro ao aqui observado, uma vez que foram identificadas 62 pleocitoses, mas apenas foram detetadas alterações da densidade em duas amostras e das PT em três.

#### 4.4. Técnicas moleculares

As alterações identificadas no LCR são muitas vezes inespecíficas. Para melhorar a capacidade de se obter um diagnóstico definitivo, devem ser utilizados testes especializados como a PCR (Lorenz *et al.*, 2011). A realização de PCR a amostras de LCR está recomendada quando se suspeita de agentes infecciosos como causa de uma meningoencefalomielite (Schatzberg & Nghiem, 2012). Esta análise é também um dos importantes passos para o diagnóstico de meningomielite não infecciosa (também conhecido como meningomielite de origem desconhecida), visto este só ser obtido após a exclusão de agentes infecciosos como causa (Dewey & Costa, 2016).

Deste modo, 32 amostras de LCR foram submetidas a PCR para pesquisa de agentes infecciosos, tendo sido pesquisados *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia spp.* e o vírus da esgana canina na totalidade das amostras, *Bartonella spp.*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* e *Cryptococcus neoformans* em 12 delas e *Mycoplasma spp.* nas 20 restantes.

Dos 62 cães em que foram identificadas alterações do LCR na análise citológica, 22 prosseguiram para PCR para pesquisa de um possível agente causador da pleocitose. Destas 22 amostras, uma apresentava uma pleocitose neutrofílica e as restantes 21 apresentavam pleocitoses de células mistas. Foram identificados agentes infecciosos em 3 das amostras, em todas elas a pleocitose presente era moderada de células mistas, tendo sido detetada a presença do vírus da esgana em duas amostras e *Toxoplasma gondii* na terceira.

É importante salientar que recomendava-se a realização deste exame a mais pacientes do que os que se realizaram. Todavia, devido a motivos de ordem económica ou devido à reduzida quantidade da amostra, tal não foi possível, podendo existir na realidade mais pleocitoses causadas por agentes infecciosos do que as 4,84% (3/62) identificadas.

Dos dados recolhidos para a realização do presente estudo cerca de 10 das 68 amostras que não apresentaram alterações nos exames previamente realizados prosseguiram para

realização de PCR e respetivos despistes. Existem várias explicações para tal decisão, desde logo a experiência dos clínicos que, com base nos sinais clínicos e história pregressa, suspeitaram fortemente de algum agente infeccioso como causa do quadro clínico, optando pela pesquisa deste, independentemente da presença ou ausência de pleocitose. Ainda mais quando se sabe que, apesar de não ser o mais usual, mesmo em doenças inflamatórias do SNC o LCR pode apresentar-se normal (LeCouteu, 2011). Outra explicação prende-se ao facto de muitos pacientes serem referenciados a partir de outros centros veterinários, chegando ao HVR já com a decisão dos exames a realizar previamente tomada, independentemente dos resultados que possam surgir durante a realização destes.

Destas 10 amostras, foi identificada a presença de *Neospora caninum* numa delas. Este resultado acabou por ser de alguma forma surpreendente, visto que à partida seria de esperar que em LCR sem alterações não se detetariam agentes infecciosos, sendo que a bibliografia refere que o espectável num LCR com *Neospora caninum* seria surgir associado a uma pleocitose de células mistas, ou até a outros tipos de pleocitoses (Gödde & Steffen, 2010; Dubey & Lappin, 2012; Muñana, 2014). Contudo, este resultado não é nenhuma novidade. A bibliografia refere a não existência de alterações no LCR em alguns cães com neosporose (Dubey, 2005; Dubey & Lappin, 2012), reforçando assim as ideias fundamentais de que o LCR não se apresenta sempre alterado na presença de doença neurológica e da necessidade de realizar múltiplos exames e análises de forma a se contraporem resultados e se alcançar um diagnóstico correto.

Do total dos 32 LCR que prosseguiram para PCR, apenas em 4 (12,5%) foi identificado algum agente patogénico, nomeadamente *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* e o vírus da esgana, este último em duas amostras diferentes. Estes resultados revelam uma prevalência destes agentes na amostra em estudo, bastante superior à descrita no trabalho de Breu *et al.* (2015), no qual foram igualmente sujeitos à técnica PCR amostras de LCR de 210 cães com sinais neurológicos. Nesse estudo foram apenas pesquisados *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Anaplasma phagocytophilum* e o vírus da esgana canina, tendo sido identificados agentes patogénicos somente em duas amostras, numa *Anaplasma phagocytophilum* e noutra *Neospora caninum*. Como tal, apenas é possível comparar os resultados obtidos relativamente aos agentes pesquisados em comum, sendo ainda assim perceptível que a prevalência destes agentes infecciosos (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e vírus da esgana canina) obtida no presente trabalho é muito maior (4/32) que o descrito por Breu *et al.* (2015), que em 210 amostras apenas numa se identificou um agente patogénico, particularmente o *Neospora caninum*. Tal pode significar que a prevalência destes agentes na área geográfica onde foram recolhidas é mais elevada, sendo porém perigoso extrapolar para a população geral, visto a amostra em estudo ser muito pequena e enviesada por apenas incluir cães com sinais neurológicos. É, contudo, importante referir que os dois cães positivos para o vírus da esgana provinham de uma associação na qual ocorreu um surto deste vírus.

O envolvimento de alguns agentes, como a *Ehrlichia spp.* e a *Borrelia spp.*, no desenvolvimento de meningoencefalomielites tem vindo a ser posto em causa devido aos baixos números destes agentes nos LCR e tecidos cerebrais de cães com esta doença (Barber *et al.*, 2010). Os dados obtidos no presente estudo vão de encontro com os dados de Barber *et al.* (2010) visto que nenhuma amostra foi positiva para a presença destes agentes infecciosos, sendo ainda assim importante salientar que ao contrário do estudo referido atrás, a amostra agora em estudo foi bastante pequena, apenas 32 cães e nem todos com uma pleocitose, sendo como tal perigoso retirar conclusões acerca destes achados e recomendando-se a investigação da prevalência dos diversos agentes em estudo numa amostra mais alargada.

Um dos fatores limitantes do presente estudo prende-se ao facto dos agentes pesquisados através da técnica de PCR terem sido processados em diferentes laboratórios externos. A pesquisa realizada a 12 amostras foi processada pelo laboratório Idexx®, incluindo *Bartonella spp.*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* e *Cryptococcus neoformans*, tendo sido excluída a pesquisa de *Mycoplasma spp.* em comparação com os outros laboratórios (Genevet® e Vetinlab®). Tal não permitiu uma uniformização das análises, ficando em aberto a presença nas amostras dos agentes não pesquisados. Outro fator que não permitiu a uniformização desta análise centra-se na utilização de diferentes técnicas de PCR por cada laboratório, não possuindo os diferentes métodos o mesmo grau de sensibilidade (DeBiasi & Tyler, 2004; Levine & Levine, 2012). Idealmente as amostras seriam todas processadas pelo mesmo laboratório, sendo pesquisados os mesmos agentes utilizando a mesma técnica de PCR.

É ainda necessário assinalar que se desconhece o verdadeiro número de cães com agentes patogénicos presentes no LCR na amostra total dos 130 pacientes. Tal deve-se ao facto dos 4 casos positivos apenas se referirem aos 32 animais cujos LCR foram submetidos a técnicas moleculares, tendo ficado de fora outros casos em que também se recomendava a utilização destas técnicas, incluindo agora aqui também as amostras que não apresentavam sinais de inflamação, porque tal como discutido atrás, mesmos LCR sem alterações podem conter um agente infeccioso. Outro fator a ter em conta prende-se às características inerentes à técnica PCR, nomeadamente à possibilidade da existência de falsos negativos, ou seja, amostras com um agente infeccioso presente, sem que este tenha sido detetado. É suposto a técnica PCR apresentar a vantagem de ter mais sensibilidade por serem necessárias poucas cópias do material genético do agente em pesquisa para a sua deteção (Levine & Levine, 2012). Contudo, existem algumas dúvidas quanto à sensibilidade e especificidade destes testes para os diferentes agentes pesquisados e para as várias modificações da técnica de PCR utilizada (Levine & Levine, 2012; Wamsley, 2014). Podem assim ocorrer falsos negativos por diversas razões, como a ausência de material genético do agente infeccioso no LCR em quantidades suficientes para ser detetado pela técnica utilizada, o material genético encontrar-se confinado ao parênquima e não no LCR, ou ainda se o agente causador da doença já não se encontrar

presente no LCR (Nghiem & Schatzberg, 2010). Como tal, é pertinente relembrar a afirmação de Di Terlizzi e Platt (2009) relativamente às técnicas moleculares, declarando estes que um resultado negativo não exclui a presença do agente infeccioso a ser pesquisado.

#### **4.5. Desfechos clínicos e a análise de LCR como preditor de desfechos clínicos**

Com o intuito de se compreender o valor do estudo do LCR como ferramenta de previsão do desfecho clínico mais provável, foi estudada a relação existente entre os diferentes desfechos clínicos, dos episódios clínicos em estudo, dos animais da amostra e entre os resultados obtidos na avaliação citológica e análise quantitativa dos LCR destes animais, bem como a relação entre estes desfechos e os resultados da pesquisa de agentes infecciosos via PCR (perfis neurológicos).

Porém, apenas se conhece o desfecho de 54 animais, devido essencialmente ao elevado número de pacientes não seguidos habitualmente no HVR, mas para lá referenciados. Consequentemente esta reduzida amostra é constituída igualmente por um reduzido número de cães com pleocitose (35, 32 de células mistas e 3 neutrófilica) e um ainda menor número de cães sem alterações no LCR, tendo o mesmo ocorrido com os diferentes desfechos. Para além desta limitação é de salientar ainda a variação do tempo de recuperação de cada animal da amostra, ou seja, o tempo decorrido entre a colheita de LCR e a avaliação da ficha clínica, visto que a amostra inclui cães cujo LCR foi colhido em janeiro de 2015 e tal como cães em que a colheita apenas se procedeu dois anos depois, tendo estes últimos muito menos tempo para a terapêutica instituída fazer efeito que os primeiros. Idealmente todos os animais seriam reavaliados com o mesmo tempo decorrido desde a colheita e durante o mesmo período de tempo.

Os 54 casos cujos desfechos se conhecem foram divididos em dois grupos, de acordo com os resultados da análise dos LCR. Assim obteve-se um grupo com 35 animais com pleocitoses e um grupo de 19 animais sem alterações no LCR. Embora não estatisticamente significativa, os desfechos clínicos dos cães com alterações no LCR foram de uma forma geral melhores que os desfechos dos cães sem alterações, com 77,2% dos primeiros a terem uma evolução do quadro clínico positiva, contra apenas 57,9% dos segundos, isto apesar da taxa de mortalidade entre os dois grupos não diferir muito, 17,1% nos cães do grupo com alterações no LCR contra 21,1% nos cães sem alterações. Estes dados são facilmente explicados pelo facto dos animais com LCR alterados encontrarem-se mais avançados no seu plano diagnóstico, estando mais perto de um diagnóstico final que os cães com LCR normais. Tal deve-se à informação passível de se extrair de um LCR alterado, uma vez que este fornece informação útil para o estabelecimento de diagnósticos diferenciais de doenças neurológicas, visto um LCR alterado indicar sempre a presença de uma alteração patológica, enquanto que um LCR normal não permite excluir a presença de doença (Vernau, 2005).

Estatisticamente não foi encontrada uma relação nem entre os desfechos e as avaliações citológicas, nem entre os desfechos e os perfis neurológicos, indicando que nenhum destes exames fornece informações passíveis de serem utilizadas como preditor do desfecho clínico, aquando a ocorrência de um episódio clínico com envolvimento neurológico. Tal pode ser justificado pelo elevado número de variáveis envolvidas, como a elevada variação de idades e raças, mas principalmente pelo elevado número de doenças que podem provocar alterações no LCR, sem que ainda assim cada uma apresente uma alteração restrita àquela mesma doença, para além de cada doença apresentar um prognóstico diferente e deste estar também dependente de inúmeros outros fatores.

O pequeno número da amostra certamente influencia os resultados obtidos, recomendando-se como tal o estudo mais detalhado e essencialmente com uma amostra maior, desta relação. Chamisha *et al.* (2015) demonstraram a utilidade do estudo do rácio entre macrófagos e monócitos do LCR, como indicador de prognóstico na avaliação da recuperação da marcha após cirurgia em cães com HD toracolombar aguda, pelo que se recomenda a avaliação da relevância deste rácio num panorama mais alargado de doenças neurológicas.

Contudo, apesar de não estatisticamente significativas, é de notar a relação existente entre algumas variáveis, como é o caso dos 3 pacientes com pleocitose neutrofílica, que tiveram todos o mesmo desfecho. Todos melhoraram, mas não obtiveram alta clínica, permanecendo todos, à data da recolha dos dados, a fazer tratamento crónico. No entanto, por serem apenas 3 casos tal retira alguma significância a este dado que poderia ser justificado pelo facto de a meningite arterite responsiva a esteroides (MARE) ser uma das causas mais comuns deste tipo de pleocitose e pelo facto do tratamento desta doença ser prolongado no tempo, sendo inclusive frequente ocorrerem recaídas (Wamsley, 2014; Biedermann, Tipold e Flegel, 2016). Relativamente à relação entre o desfecho alta clínica e as pleocitoses de células mistas, salienta-se que 12 dos 16 cães com este desfecho clínico, ou seja 75%, apresentavam uma pleocitose de células mistas.

Por último é de notar que todos os pacientes com um agente infeccioso identificado via PCR, melhoraram, mas não obtiveram alta clínica, tal como ocorreu com os 3 pacientes com pleocitose neutrofílica. Em ambas as situações e, tal como referido anteriormente, o tamanho da amostra impede de alguma forma de tecer considerações 100% assertivas e extrapolá-las para a população em geral, possuindo como tal, a interpretação destes dados as mesmas limitações.

O prognóstico dos animais infetados com esgana e a gravidade dos seus sinais clínicos variam marcadamente dependendo das características do vírus, da idade do animal e do estado imunológico do paciente (Martella & Elia, 2008). O prognóstico para os cães infetados com esgana e com envolvimento neurológico é de forma geral fraco, especialmente nos casos com progressão rápida dos sinais de disfunção neurológica, com muitos dos cães a morrerem ou a serem eutanasiados devido a estes sinais. Contudo, nem sempre a doença é fatal,

podendo os sinais clínicos da doença estagnarem ou melhorarem e os animais sobreviverem com défices neurológicos residuais (Muñana, 2014, Dewey, 2016). À época da recolha de informações para o presente trabalho os dois cães com esgana estavam vivos tendo inclusive melhorado, sem que tivessem tido alta. O mesmo ocorreu com os dois cães positivos para a presença de protozoários, um com *Toxoplasma gondii* e outro com *Neospora caninum*. O prognóstico para os animais afetados com estes protozoários é reservado a pobre (Jaggy, 2010; Dewey, 2016), porém tipicamente os sinais clínicos melhoram com o tratamento, podendo ainda assim não resolver todos os sinais devido às lesões permanentes, para além de poderem ocorrer recaídas (Muñana, 2014).

#### **4.6. Raças e pleocitoses**

A raça pura mais comum da amostra é a Beagle, representando estes cães 6,9% (9/130) do total da amostra. O LCR de 55,6% (5/9) dos cães desta raça não apresentavam alterações, já os restantes Beagles com alterações no seu LCR apresentaram maioritariamente pleocitose neutrofílica, com 33,3% (3/9) destes cães a apresentarem o tipo de pleocitose referido versus os apenas 11,1% (1/9) com pleocitose de células mistas, ao contrário do que ocorre com o resto da amostra de cães não Beagle, em que é mais comum apresentarem uma pleocitose de células mistas 44,6% (54/121) do que neutrofílica 3,3% (4/121). Estatisticamente esta relação entre cães de raça Beagle e LCR com pleocitoses neutrofílica é significativa, indicando que esta raça tendencialmente apresenta pleocitoses neutrofílicas.

Esta relação pode ser justificada pelo facto desta raça ser uma das raças tipicamente afetadas pela MARE, também conhecida como síndrome da dor do Beagle, vasculite necrotizante, meningite supurativa asséptica, entre outras denominações (Tipold & Schatzberg, 2010; Schatzberg & Nghiem, 2012; Wamsley, 2014; Dewey & Costa, 2016) e pelo facto desta doença ser uma das causas mais comuns deste tipo de pleocitose em cães (Wamsley, 2014). Como tal, quando um Beagle se apresenta à consulta com sinais neurológicos, como um dos diagnósticos diferenciais principais deve fazer parte a MARE, visto esta provocar este tipo de pleocitoses, isto se os sinais clínicos não a excluïrem.

#### **5. Conclusões e perspectivas futuras**

Por se tratar de um estudo retrospectivo, o presente trabalho apresenta diversas limitações. Uma das mais evidentes centra-se na falta de homogeneidade de informação disponível dos casos de estudo, no que respeita aos parâmetros em análise. Tal tem como consequência a flutuação do tamanho da amostra para cada um desses parâmetros, sendo em várias ocasiões demasiado pequena para se poder extrair qualquer conclusão. Também inerente ao tipo de estudo, outra limitação advém da dificuldade de interpretação das informações

disponíveis nas fichas de historial clínico, escritas por diferentes clínicos. Consequentemente estes fatores dificultaram não só a análise estatística dos dados e a interpretação dos resultados como em última análise, encontrar diferenças estatisticamente significativas.

Na medicina moderna a análise do LCR é considerada uma ferramenta extremamente útil, sendo em alguns casos indispensável para o diagnóstico de diversas doenças neurológicas e controlo da evolução clínica dos pacientes. Tendo em conta a importância desta análise, procurou-se perceber se as conclusões extraídas desta possuem algum valor como ferramenta de prognóstico. Os dados estudados revelaram que, apesar dos cães com alterações no LCR terem de forma geral um desfecho clínico mais favorável, não existe uma diferença estatisticamente significativa que suporte esta ideia. Porém, tal descoberta, ou a falta dela, não retira de forma alguma importância a este exame complementar, com a autora inclusive a recomendar um estudo, preferencialmente prospetivo, mais incisivo sobre as várias alterações específicas do LCR e os desfechos clínicos de cães de uma amostra maior e seguidos durante um período de tempo mais alargado.

A bibliografia existente não é concordante quanto ao tipo de pleocitose mais frequentemente encontrado. Na amostra em estudo as pleocitoses de células mistas demonstraram inequivocamente uma frequência mais elevada que qualquer outra alteração. Todavia, a variedade de alterações encontradas demonstrou-se surpreendentemente reduzida, com um dos tipos de pleocitose, referidos na bibliografia como dos mais frequentes, a não estar presente em nenhuma amostra do estudo.

A frequência de pleocitoses e de agentes infecciosos nos LCR analisados neste estudo foi superior à descrita na bibliografia. Estes dados juntamente com a presença de uma amostra sem aumento da contagem de células nucleadas, mas na qual foi identificada *Neospora caninum*, reforçam a ideia da importância de investigar o LCR dos cães com doença neurológica, não só pelos métodos laboratoriais tradicionais, mas especialmente recorrendo à tecnologia que na atualidade se encontra facilmente disponível, o PCR, visto ter demonstrado um número superior de casos que os encontrados em estudos realizados noutros países. Percebe-se também através do caso atrás exposto, que os clínicos não necessitam de justificar o recurso às técnicas moleculares apenas pela presença de uma pleocitose, mas sim nos sinais clínicos e diagnósticos diferenciais para cada caso.

Procurou-se perceber se alguma característica intrínseca aos pacientes os predispunha para um tipo específico de alteração no LCR, tendo os cães de raça Beagle demonstrado uma associação com as pleocitoses neutofílicas. Esta associação pode ser justificada por a raça Beagle ser uma das raças tipicamente afetadas pela MARE e por esta ser uma das causas mais comuns deste tipo de pleocitose. Contudo seriam necessários mais estudos sobre o tema, que incluíssem o diagnóstico final e sua confirmação por histopatologia.

Já existindo estudos que relacionam o valor diagnóstico do LCR com o de outros exames complementares, as investigações parecem virar-se agora para a estudo de biomarcadores

no LCR, pelo que seria interessante em futuros trabalhos tentar-se compreender o enquadramento clínico destas técnicas e sua utilidade na prática clínica.

Em suma, conclui-se que mais importante que qualquer exame complementar em concreto, é a realização de um bom exame físico e neurológico e de uma boa recolha da história pregressa do paciente, pois só com estes dados se pode decidir qual o passo seguinte, tendo sempre em mente que um LCR normal não exclui a presença de uma doença neurológica, que as alterações nem sempre coincidem com o referido na bibliografia e que sempre que se suspeita de qualquer agente infeccioso como causa de meningite, independentemente das alterações analíticas registadas, é sempre conveniente recorrer às técnicas moleculares.



## Bibliografia

- Abate, O., Bollo, E., Lotti, D., & Bo, S. (1998). Cytological, immunocytochemical and biochemical cerebrospinal fluid investigations in selected central nervous system disorders of dogs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 45(1–10), 73–85.
- Adamo, P. F. (2010). Cerebrospinal fluid collection, myelography, epidurography and discography. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman, *Textbook of veterinary internal medicine* (7th ed., pp 447-449). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier.
- Almeida, F. F. D. (2013). *A importância clínica da análise do líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico de afecções do sistema nervoso central do cão*. Dissertação de mestrado integrado em medicina veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Bartlett, J. M. (2003). Technical notes for the detection of nucleic acids. In J. M. Bartlett & D. Stirling, *PCR Protocols* (2nd ed., pp. 65-69). Totowa, USA: Humana Press.
- Bateman, G. A., & Brown, K. M. (2012). The measurement of CSF flow through the aqueduct in normal and hydrocephalic children: from where does it come, to where does it go? *Child's Nervous System*, 28(1), 55–63.
- Biedermann, E., Tipold, A., & Flegel, T. (2016). Relapses in dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 57(2), 91-95.
- Bohn, A. A., Wills, T. B., West, C. L., Tucker, R. L. & Bagley, R. S. (2006). Cerebrospinal fluid analysis and magnetic resonance imaging in the diagnosis of neurologic disease in dogs: a retrospective study. *Veterinary clinical pathology*, 35(3), 315-320.
- Breu, D., Guthardt, J., & Müller, E. (2015). Analyses of cerebrospinal fluid (CSF) samples of 210 dogs with neurological symptoms [abstract]. *Congress of the european college of veterinary internal medicine (ECVIM), Lisboa, Portugal, Setembro 2015*. ECVIM Research Communications.
- Brinker, T., Stopa, E., Morrison, J., & Klinge, P. (2014). A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids and Barriers of the CNS*, 11(1), 10.
- Brodelt, A., & Stoodley, M. (2010). An anatomical and physiological basis for CSF pathway disorders, (pp 8-13). In C. Mallucci & S. Sgouros (eds.), *Cerebrospinal fluid disorders*. CRC Press.
- Chamisha Y, Aroch I, Kuzi S, Srugo I, Bdolah-Abram T, Chai O, Christopher MM, Merbl Y, Rothwell K, Shamir MH. (2015). The prognostic value of cerebrospinal fluid characteristics in dogs without deep pain perception due to thoracolumbar disc herniation. *Research in veterinary science*, 100, 189-196.
- Chrisman, C. L. (1992). Cerebrospinal fluid analysis. *Veterinary clinics of north america: small animal practice*, 22(4), 781-810.
- Coates J. R., & O'Brien D. P. (2017) Brain disease. In S. J. Ettinger, E. C. Feldman & E. Côté, *Textbook of veterinary internal medicine*, (8th ed., pp. 1385). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier.

- Cohen, L., Athaide, V., Wickham, M. E., Doyle-Waters, M. M., Rose, N. G., & Hohl, C. M. (2015). The effect of ketamine on intracranial and cerebral perfusion pressure and health outcomes: a systematic review. *Annals of emergency medicine*, 65(1), 43-51.
- Cook, J. R., & DeNicola, D. B. (1988). Cerebrospinal fluid. *Veterinary clinics of north america: small animal practice*, 18(3), 475–499.
- Cook, J. R., & Levine, G. J. (2014). Cerebrospinal fluid and central nervous system cytology. In A. C. Valenciano & R. L. Cowell (Eds.), *Cowell and Tyler's diagnostic cytology and hematology of the dog and cat* (4th ed). Missouri, USA: Mosby Elsevier.
- Cooper, J. J., Schatzberg, S. J., Vernau, K. M., Summers, B. A., Porter, B. F., Siso, S., Young, B. D., & Levine, J. M. (2014). Necrotizing meningoencephalitis in atypical dog breeds: a case series and literature review. *Journal of veterinary internal medicine*, 28(1), 198-203.
- De Lahunta, A., Glass, E., & Kent M. (2014). Cerebrospinal fluid and hydrocephalus. In A. De Lahunta, E. Glass & M. Kent, *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology* (4th ed.). St. Luis, USA: Saunders Elsevier.
- De Lorenzi, D. & Mandara, M. T. (2016). The central nervous system. In R. E. Raskin & D. J. Meyer. *Canine and Feline Cytology*, (3th ed.). (pp. 369-390). St. Luis, USA: Saunders Elsevier.
- DeBiasi, R. L., & Tyler, K. L. (2004). Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 903-925.
- Desnoyers M., Bédard C., Meinkoth J. H., & Crystal M. A. (2008). Cerebrospinal fluid analysis. In R. Cowell, R. Tyler, J. Meinkoth & D. De Nicola, *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*. (3th ed.). St. Louis, Missouri, USA: Mosby Elsevier.
- Dewey, C. W. & Da Costa, R. C. (2016). Myelopathies: disorders of the spinal cord. In C. W. Dewey & R. C. Da Costa, *Practical guide to canine and feline neurology*, (3th ed). Ames, Iowa, USA: John Wiley & Sons.
- Dewey, C. W. (2016). Encephalopathies: disorders of the brain. In C. W. Dewey & R. C. Da Costa, *Practical guide to canine and feline neurology*, (3th ed). Ames, Iowa, USA: John Wiley & Sons.
- Dewey, C. W., Da Costa, R. C. & Ducoté, J. M. (2016). Neurodiagnostics. In C. W. Dewey & R. C. Da Costa, *Practical guide to canine and feline neurology*, (3th ed). Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Di Terlizzi, R., & Platt, S. (2006). The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I–function and composition. *The Veterinary Journal*, 172(3), 422-431.
- Di Terlizzi, R., & Platt, S. R. (2009). The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part II - analysis. *The Veterinary Journal*, 180(1), 15–32.
- Diogo, C. & Camassa, J. (2013). Doenças inflamatórias não infecciosas no sistema nervoso central de cães. *Veterinária em Foco*, 11(1).
- Doyle, C., & Solano-Gallego, L. (2009). Cytologic interpretation of canine cerebrospinal fluid samples with low total nucleated cell concentration, with and without blood contamination. *Veterinary clinical pathology*, 38(3), 392-396.

- Dubey, J. P., & Lappin, M. R. (2012). Toxoplasmosis and neosporosis. In C. E. Greene, *Infectious diseases of the dog and cat*, (4<sup>th</sup> ed.). (pp. 815-827). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Health Sciences.
- Dubey, J.P. (2005). Infectious diseases dentistry: neosporosis in dogs. *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association Congress*, Mexico City, Mexico 2005. International Veterinary Information Service.
- Elias, A., & Brown, C. (2008). Cerebellomedullary cerebrospinal fluid collection in the dog. *Lab animal*, 37(10), 457-458.
- Evans, M. F. (2009). The polymerase chain reaction and pathology practice. *Diagnostic histopathology*, 15(7), 344-356.
- Fletcher, T. F. (2006). *Lab 3 – Brain gross anatomy*. Acedido em Abr. 22, 2017, disponível em: <http://vanat.cvm.umn.edu/neurLab3/index.html>
- Fletcher, T. F., & Weber, A. F. (2013). Veterinary developmental anatomy (Veterinary Embryology). *University of Minnesota*. EUA.
- Fry, M. M., Vernau, W., Kass, P. H., & Vernau, K. M. (2006). Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. *Veterinary clinical pathology*, 35(1), 72-77.
- Furr, M. (2015). Cerebrospinal fluid and the blood–brain barrier. In M. Furr & S. Reed, *Equine neurology*. (2nd ed). New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Gaitero, L., Añor, S., Montoliu, P., Zamora, Á., & Pumarola, M. (2006). Detection of neospora caninum tachyzoites in canine cerebrospinal fluid. *Journal of Veterinary internal Medicine*, 20(2), 410-414.
- Garma-Aviña, A. (2004). An inexpensive sedimentation chamber for the preparation of cytologic specimens of cerebrospinal fluid. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 16(6), 585-587.
- Gil, V. (n.d.). neuroanatomy of the dog: meninges. Acedido em 27 de Abril de 2017, disponível em: <https://www.neuroanatomyofthedog.com/brain-meninges-and-ventricular-system>
- Glaus, T. (2010). Neuropharmacology. In A. Jaggy, (Ed.). *Small animal neurology: an illustrated text*. (pp.186). Hanôver, Germany: Schlütersche.
- Gödde, T. & Steffen, F. (2010). Brain stem. In A. Jaggy, (Ed.). *Small animal neurology: an illustrated text*. Hanôver, Germany: Schlütersche.
- Green, S. M., Andolfatto, G., & Krauss, B. S. (2015). Ketamine and intracranial pressure: no contraindication except hydrocephalus. *Annals of emergency medicine*, 65(1), 52-54.
- Greene, C. E. & Vandevelde, M. (2012). Canine distemper. In C. E. Greene, *Infectious diseases of the dog and cat*, (4th ed.). (pp. 34). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Health Sciences.
- Hahn, C. & Mast, J. (2015). Overview of neuroanatomy. In M. Furr & S. Reed, *Equine neurology*. (2nd ed., pp.4-5). New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Hall, J. E. (2016). Cerebral blood flow, cerebrospinal fluid and brain metabolism. In J. E. Hall, *Guyton and hall textbook of medical physiology*. (13th ed., pp. 791–793). Philadelphia, USA: Elsevier.

- Hugo, T. B., Heading, K. L. & Labuc, R.H. (2014). Canine cerebrospinal fluid total nucleated cell counts and cytology associations with the prevalence of magnetic resonance imaging abnormalities. *Dove Press*, (5), 75-84.
- Hurt, A. E., & Smith, M. O. (1997). Effects of iatrogenic blood contamination on results of cerebrospinal fluid analysis in clinically normal dogs and dogs with neurologic disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 211(7), 866-867.
- Jaggy, A. (Ed.). (2010). Brain stem. In A. Jaggy, (Ed.). *Small animal neurology: an illustrated text*. Hanôver, Germany: Schlütersche.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2008). Tecido nervoso. In L. C. Junqueira & J. Carneiro, *Histologia básica* (11ª edição, pp. 165–169). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Kaewmongkol, G., Maneesaay, P., Suwanna, N., Tiraphut, B., Krajarngjang, T., Chouybumrung, A., Kaewmongkol, S., Sirinarumitr, T., Jittapalapong, S. & Fenwick, S. G. (2016). First detection of *ehrlichia canis* in cerebrospinal fluid from a nonthrombocytopenic dog with meningoencephalitis by broad-range PCR. *Journal of veterinary internal medicine*, 30(1), 255-259.
- Kerwin, A. J., Schinco, M. A., Tepas III, J. J., Renfro, W. H., Vitarbo, E. A., & Muehlberger, M. (2009). The use of 23.4% hypertonic saline for the management of elevated intracranial pressure in patients with severe traumatic brain injury: a pilot study. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 67(2), 277-282.
- Klein, B. G. (2014). Líquido cefalorraquidiano e barreira hematoencefálica. In B. G. Klein, *Cunningham tratado de fisiologia veterinária*. (5ª edição, pp. 138–144). Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier.
- König, H. E., Liebich, H.-G. & Creveny, C. (2004). Nervous system. In H. E. König & H.-G. Liebich (Eds.), *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook and Colour Atlas*, (pp. 489-492). Stuttgart, Germany: Schattauer
- Kulkarni, M.D., Samant, S. R., Yadav, G. B., Khanvilkar, A. V., Khasnis, M. W. (2009). Diagnostic Importance of Cerebrospinal Fluid in Pathognomic Condition. *Veterinary World*, 2(11):441-443.
- LeCouteur, R. A. (2011). Canine idiopathic inflammatory CNS disease. *Consultant on Call, NAVC clinician's brief*. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em <https://www.cliniciansbrief.com/sites/default/files/sites/cliniciansbrief.com/files/IdiopathicCNSDisease.pdf>
- Levine, G. J., Levine, J. M., Witsberger, T. H., Kerwin, S. C., Russell, K. E., Suchodolski, J., Steiner, J. & Fosgate, G. T. (2010). Cerebrospinal fluid myelin basic protein as a prognostic biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disk herniation. *Journal of veterinary internal medicine*, 24(4), 890-896.
- Levine, J. & Levine, G. (2012). Neurologic disorder. In M. Willard & H. Tvedten. *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*, (5th ed., pp 309-312). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Lorenz, M. D., Coates, J. R. & Kent, M. (2011). Confirming a diagnosis. In Lorenz, M. D., Coates, J. R. & Kent, M. (Eds.) *Handbook of veterinary neurology* (5th ed.). St. Louis, Missouri, USA: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

- Loughin, C. A. (2015). Chiari-like malformation. *Veterinary clinics: small animal practice*, 46(2), 231-242. Elsevier Inc.
- Lowrie, M., Penderis, J., McLaughlin, M., Eckersall, P. D., & Anderson, T. J. (2009). Steroid responsive meningitis-arteritis: A prospective study of potential disease markers, prednisolone treatment, and long-term outcome in 20 dogs (2006–2008). *Journal of veterinary internal medicine*, 23(4), 862-870.
- Lunn, J. A., Lee, R., Smaller, J., MacKay, B. M., King, T., Hunt, G. B., Martin, P., Krockenberger, M. B., Spielman, D. & Malik, R. (2012). Twenty two cases of canine neural angiostrongylosis in eastern Australia (2002-2005) and a review of the literature. *Parasites & vectors*, 5(1), 70.
- Maiolini, A., Carlson, R., Schwartz, M., Gandini, G., & Tipold, A. (2012). Determination of immunoglobulin A concentrations in the serum and cerebrospinal fluid of dogs: An estimation of its diagnostic value in canine steroid-responsive meningitis–arteritis. *The veterinary journal*, 191(2), 219-224
- Mankin, J. M. (2017). Top 5 Antibiotics for Neurologic Infections in Dogs. Acedido em 18 de Maio de 2017, disponível em: <https://www.cliniciansbrief.com/article/top-5-antibiotics-neurologic-infections-dogs>
- Marcos, R. & Santos, M. (2011). Líquido cefalorraquidiano. In M. C. Peleteiro, R. Marcos, M. Santos, J. Correia, H. Pissarra, & T. Carvalho (Eds.). *Atlas de citologia veterinária*. (pp 249 - 261). Portugal: Lidel - Edições Técnicas, Lda.
- Mariani, C. L., Boozer, L. B., Braxton, A. M., Platt, S. R., Vernau, K. M., McDonnell, J. J., & Guevar, J. (2013). Evaluation of matrix metalloproteinase-2 and-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with intracranial tumors. *American journal of veterinary research*, 74(1), 122-129.
- Martella, V., Elia, G., & Buonavoglia, C. (2008). Canine distemper virus. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 38(4), 787-797.
- Matsuki, N., Fujiwara, K., Tamahara, S., Uchida, K., Matsunaga, S., Nakayama, H., Doi, K., Ogawa, H. & Ono, K. (2004). Prevalence of autoantibody in cerebrospinal fluids from dogs with various CNS diseases. *Journal of veterinary medical science*, 66(3), 295-297.
- McGeady, T. A., Quinn, P. J., Fitzpatrick, E. S., Ryan, M. T., Kilroy, D., & Lonergan, P. (2017). Nervous system. In T. A. McGeady, P. J. Quinn, E. S. Fitzpatrick, M. T. Ryan, D. Kilroy, & P. Lonergan. *Veterinary embryology*. (2nd ed., pp. 184-185). Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Mohammad-Zadeh, L. F. & Sisson, A. F. (2005). Cerebrospinal fluid collection & analysis. *Procedures pro, NAVC clinician's brief*. Acedido em Feb. 16, 2017, disponível em <https://www.cliniciansbrief.com/sites/default/files/sites/cliniciansbrief.com/files/11-1.pdf>
- Molina, J. (2015). Capítulo Pruebas complementarias. In J. Molina, *Manual práctico de neurología veterinária*, (pp. 28-33). Espanha: Editorial Servet.
- Moore, A. R. & Barger, A. M. (2017). Central nervous system cytology. In A. M. Barger & A. L. MacNeill (Eds.). *Small animal cytologic diagnosis*. (pp.95-127). Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group.

- Muñana, K. R. (2014). Head tilt and nystagmus. In S. R. Platt & N. J. Olby, *BSAVA Manual of canine and feline neurology*. (4th ed., pp. 209). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Nagano, S., Kim, S. H., Tokunaga, S., Arai, K., Fujiki, M., & Misumi, K. (2011). Matrix metalloprotease-9 activity in the cerebrospinal fluid and spinal injury severity in dogs with intervertebral disc herniation. *Research in veterinary science*, 91(3), 482-485.
- Nghiem, P. P., & Schatzberg, S. J. (2010). Conventional and molecular diagnostic testing for the acute neurologic patient. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 46-61.
- Nind F. (2011). Introdução. In Fitzmaurice S. N., *Série clínica veterinária na prática: Neurologia em pequenos animais*. (pp. xi). Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier.
- Nishida, H. (2014). Biomarkers for neural injury and infection in small animals. *Veterinary clinics: small animal practice*, 44(6), 1187-1199.
- Nye, C. & Troxel, M. (2017). *Clinician's brief: neurologic examination*. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em <https://www.cliniciansbrief.com/article/neurologic-examination>
- Pereira, A. L. C., Bolzani, F. C. B., Stefani, M., & Charlín, R. (2007). Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. *Med Cutan Iber Lat Am*, 35(1), 35-50.
- Petzold, A., Keir, G., & Sharpe, L. T. (2004). Spectrophotometry for xanthochromia. *New england journal of medicine*, 351(16), 1695-1696.
- Platt, S. R. & Freeman A. C. (2014). Neck and back pain. In S. R. Platt & N. J. Olby, *BSAVA Manual of canine and feline neurology*. (4th ed.). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Platt, S. R. & Garosi, L. (2012). Preface. In S. Platt, & L. Garosi, *Small animal neurological emergencies*, (pp. 354). London, UK: Manson Publishing.
- Platt, S. R. & Olby, N. J. (2014). Preface. In S. R. Platt & N. J. Olby, *BSAVA Manual of canine and feline neurology*. (4th ed). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Pouramini, A., Jamshidi, S., Shayan, P., Ebrahimzadeh, E., Namavari, M., & Shirian, S. (2017). Molecular and serological detection of neospora caninum in multiple tissues and CSF in asymptomatic infected stray dogs. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 11(2), 105-112.
- Radaelli, S. T., & Platt, S. R. (2002). Bacterial meningoencephalomyelitis in dogs: a retrospective study of 23 cases (1990-1999). *Journal of veterinary internal medicine*, 16(2), 159-163.
- Rodríguez-Boto, G., Rivero-Garvía, M., Gutiérrez-González, R., & Márquez-Rivas, J. (2015). Conceptos básicos sobre la fisiopatología cerebral y la monitorización de la presión intracraneal. *Neurología*, 30(1), 16-22.
- Roerig, A., Carlson, R., Tipold, A., & Stein, V. M. (2013). Cerebrospinal fluid tau protein as a biomarker for severity of spinal cord injury in dogs with intervertebral disc herniation. *The Veterinary Journal*, 197(2), 253-258.

- Rossmeisl, J. H. (2017). Cerebrospinal fluid collection, analysis, and myelography, In S. J. Ettinger, E. C. Feldman & E. Côté, *Textbook of veterinary internal medicine*, (8th ed., pp. 444, 445). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier.
- Ruotsalo, K., Poma, R., da Costa, R. C., & Bienzle, D. (2008). Evaluation of the ADVIA 120 for analysis of canine cerebrospinal fluid. *Veterinary clinical pathology*, 37(2), 242-248.
- Rusbridge C. (1997). Collection and interpretation of cerebrospinal fluid in cats and dogs. In *Practice*, 19:322-31.
- Sadler, T. (2016). Sistema nervoso central. In T. Sadler, *Langman embriologia clinica*. (13ª Edição). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan Ltda.
- Saito, T. B., Alfieri, A. A., Wosiacki, S. R., Negrao, F. J., Morais, H. S. A., & Alfieri, A. F. (2006). Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in veterinary science*, 80(1), 116-119.
- Sakka, L., Coll, G., & Chazal, J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128(6), 309–316.
- Sandhaus, L. M., Dillman, C. A., Hinkle, W. P., MacKenzie, J. M., & Hong, G. (2017). A new automated technology for cerebrospinal fluid cell counts comparison of accuracy and clinical impact of gloCyte, sysmex XN, and manual methods. *American journal of clinical pathology*, 147(5), 507-514.
- Schatzberg, S. & Nghiem, P. (2012). Infectious and inflammatory diseases of the CNS. In S. Platt, & L. Garosi, *Small animal neurological emergencies*, (pp. 354). London, UK: Manson Publishing.
- Sidman, R., Spitalnic, S., Demelis, M., Durfey, N., & Jay, G. (2005). Xanthochromia? by what method? a comparison of visual and spectrophotometric xanthochromia. *Annals of emergency medicine*, 46(1), 51-55.
- Sinowatz, F. (2010). Development of the central and peripheral nervous system. In P. Hyttel, F. Sinowatz, M. Vejlsted & K. Betteridge (Eds.), *Essentials of Domestic Animal Embryology*. Philadelphia, USA: Elsevier Health Sciences.
- Smith-Maxie, L. L., Parent, J. P., Rand, J., Wilcock, B. P., & Norris, A. M. (1989). Cerebrospinal fluid analysis and clinical outcome of eight dogs with eosinophilic meningoencephalomyelitis. *Journal of veterinary internal medicine*, 3(3), 167-174.
- Snell, R. S. (2006). Sistema ventricular, o líquido cefalorraquidiano e barreira hematoencefálica e hemorraquídica. In *Neuroanatomia Clínica*, (6.ª Edição, pp. 497-498). Brasil: Guanabara Koogan.
- Sweeney, C. R., & Russell, G. E. (2000). Differences in total protein concentration, nucleated cell count, and red blood cell count among sequential samples of cerebrospinal fluid from horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(1), 54-57.
- Taylor, S. M. (2015). Exames diagnósticos do sistema neuromuscular. In R. W. Nelson & C. G. Couto, *Medicina interna de pequenos animais* (5ª edição, pp. 990–999). Rio de Janeiro, Brasil: Mosby Elsevier.
- Taylor, S. M. (2016). Cerebrospinal fluid collection. In S. M. Taylor, *Small animal clinical techniques* (2nd ed, pp. 244-251). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier.

- Thomson, C., Hahn, C., & Johnson, C. (2012). Neurohistology, physiology and supporting structures. In C. Thomson & C. Hahn, *Veterinary neuroanatomy: a clinical approach* (pp. 17–29). Edinburgh, UK: Saunders Elsevier.
- Tipold, A. (1995). Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9(5), 304-314.
- Tipold, A., & Schatzberg, S. J. (2010). An update on steroid responsive meningitis-arteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 51(3), 150-154.
- Turner, J. (2000). Intracranial pressure. In Matta, B. F., Menon, D. K. & Turner, J. M. (Eds.), *Textbook of neuroanaesthesia and critical care* (pp. 53–61). London: Greenwich Medical Media LTD.
- Uemura, E. E. (2015). *Fundamentals of canine neuroanatomy and neurophysiology*. Ames, Iowa, USA: John Wiley & Sons. Acedido em Abr. 3, de 2017, disponível em [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=MWIIcGAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&dq=Fundamentals+of+canine+neuroanatomy+and+neurophysiology&ots=9Z1szlerU7&sig=AUyK38BAb5uPIZOQ4CoZ7vgyuok&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Fundamentals%20of%20canine%20neuroanatomy%20and%20neurophysiology&f=false](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=MWIIcGAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&dq=Fundamentals+of+canine+neuroanatomy+and+neurophysiology&ots=9Z1szlerU7&sig=AUyK38BAb5uPIZOQ4CoZ7vgyuok&redir_esc=y#v=onepage&q=Fundamentals%20of%20canine%20neuroanatomy%20and%20neurophysiology&f=false)
- Uemura, E. E. (Eds.). (2015). Nervous Tissue. In W. O. Reece, H. H. Erickson, J. P Goff, & E. E Uemura (Eds.), *Dukes' physiology of domestic animals*. (13th ed., pp. 8-11). Ames, Iowa, USA: John Wiley & Sons.
- Vernau W., Vernau K. A., & Bailey C. S. (2008). Cerebrospinal fluid. In J. J. Kaneko, J. W. Harvey & M. L. Bruss (Eds.), *Clinical biochemistry of domestic animals*. (6th ed.). San Diego, USA: Elsevier.
- Vernau, W. (2005). Cerebrospinal fluid assessment in dogs and cats. In *Proceedings of the 50° Congresso nazionale multisala SCIVAC*, (pp. 1–3). Rimini, Italia.
- Wamsley, H. (2014). Clinical pathology. In S. R. Platt & N. J. Olby, *BSAVA Manual of canine and feline neurology*, (4th ed.). Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Wang, X., Ding, X., Tong, Y., Zong, J., Zhao, X., Ren, H., & Li, Q. (2014). Ketamine does not increase intracranial pressure compared with opioids: meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Anesthesia*, 28(6), 821-827.
- Weber, J., Maiolini, A., & Tipold, A. (2012). Evaluation of decreased glucose levels in the cerebrospinal fluid of dogs. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, 40(5), 325-332.
- Welch, K.M.A., Caplan, L.R., Reis, D.J., Siesjo, B.K., Weir, B. (Eds.), (1997). *Primer on cerebrovascular diseases*. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Wilson, J. W., & Stevens, J. B. (1977). Effects of blood contamination on cerebrospinal fluid analysis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 171(3), 256-258.
- Windsor, R. C., Sturges, B. K., Vernau, K. M., & Vernau, W. (2009). Cerebrospinal fluid eosinophilia in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(2), 275-281.



- Witsberger, T. H., Levine, J. M., Fosgate, G. T., Slater, M. R., Kerwin, S. C., Russell, K. E., & Levine, G. J. (2012). Associations between cerebrospinal fluid biomarkers and long-term neurologic outcome in dogs with acute intervertebral disk herniation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(5), 555-562.
- Wolburg, H., & Paulus, W. (2010). Choroid plexus: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 75-88.
- Wood, A., Garosi, L., & Platt, S. (2012). Cerebrospinal fluid analysis. In L. Garosi & S. Platt, *Small animal neurological emergencies* (pp. 121–136). London, UK: Manson Publishing.

## Anexos

**Anexo I** - Características citológicas, considerações especiais ou diagnósticos diferenciais e comentários (extraído e traduzido de De Lorenzi & Mandara, 2016).

<b>Características citológicas</b>	<b>Considerações especiais ou diagnósticos diferenciais</b>	<b>Comentários</b>
Inflamação neutrofílica leve a moderada	Infeção bacteriana, fúngica, protozoária, parasitária, rickettsial ou viral	Depende de espécie, tipo de infeção, envolvimento focal ou difuso, presença de necrose concomitante; a presença de protozoários ou fungos/leveduras ou bactérias intracelulares confirmam o diagnóstico
25% a 50% de neutrófilos, com ou sem aumento da proteína, com ou sem pleocitose	Neoplasia	Depende do tipo de neoplasia, localização, presença de necrose concomitante; células neoplásicas raramente são vistas no LCR
Inflamação neutrofílica marcada (meningite supurativa)	Outras afeções não infecciosas	Considerar traumatismo, degeneração, imunomediado, associação a condições metabólicas, isquemia
Pleocitose com predomínio de neutrófilos (> 50%), frequentemente com aumento da proteína	Infeção bacteriana	Pode ser focal (abscesso) ou difuso (meningoencefalomielite); bactérias intracelulares confirmam diagnóstico
	Encefalite viral grave	Especialmente peritonite infecciosa felina (FIP) em gatos
	Vasculite necrotizante	Pode ter base imunomediada ou infecciosa; Boiadeiro de Berna e Beagles
	Meningite-arterite responsiva a esteroides	Responsivo aos glucocorticoides, mas deve-se descartar causas infecciosas

	Reação pós-mielografia (geralmente dentro de 24-48 horas)	História de recente, prévia mielografia
	Neoplasias	Especialmente meningiomas, mas pode ocorrer com qualquer neoplasia, especialmente se associada a necrose
	Traumatismo	A história pode ajudar se o traumatismo foi observado
	Hemorragia	A história pode ajudar; pode ter uma causa subjacente traumática, degenerativa, metabólica, infecciosa, neoplásica ou outra
	Hidrocefalia adquirida	Pode depender da causa subjacente da afeção adquirida
Inflamação celular mista com variedade de tipos celulares (nenhum tipo de célula predominante)	Frequentemente interpretado como representando inflamação granulomatosa - considerar infecção por fungos, protozoários, parasitas ou rickettsias	A presença de organismos fúngicos ou protozoários é confirmatória
Mistura de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e, por vezes, de plasmócitos, com ou sem aumento das proteínas, com ou sem pleocitose	Algumas doenças inflamatórias ou degenerativas idiopáticas	Especialmente meningoencefalomielite granulomatosa (MEG)
	Infeções bacterianas crônicas inadequadamente tratadas ou resposta inicial ao tratamento antibacteriano	História e diagnóstico prévio ajudam
Inflamação não supurativa (pleocitose mononuclear)	Infeção viral, bacteriana, fúngica, protozoária, parasitária ou rickettsial	Especialmente meningoencefalomielite viral não-FIP em gatos e esgana em cães
	Encefalite necrotizante de cães de raças pequenas	Os sinais clínicos e a predominância linfocítica ajudam no diagnóstico, mas o diagnóstico definitivo requer

		histopatologia; não responde aos glucocorticoides
	Neoplasia	Células neoplásicas raramente são vistas no LCR
	Condições não infecciosas ou degenerativas	Considerar a MEG; pode exigir a eliminação de outras causas possíveis e a consideração de múltiplos fatores para se chegar a um diagnóstico clínico
Inflamação eosinofílica	Infeções parasitárias, protozoárias, bacterianas, virais, fúngicas ou rickettsiais	Manifestação incomum relatada em vários tipos de doença
Pleocitose com predomínio de eosinófilos	Neoplasia	Ocasionalmente visto em neoplasia
	Reação de hipersensibilidade	Considerar as reações vacinais ou outros componentes de hipersensibilidade associados a origem infecciosa ou não infecciosa
	Processo inflamatório	Pode ser visto como parte de um processo inflamatório inespecífico

**Anexo II** – Diagnósticos diferenciais com base na contagem total de células nucleadas  
(extraído e traduzido de Wood *et al*, 2012)

<b>5–25 células/<math>\mu</math>l</b>	Vascular *, traumatismo *, neoplasia, HD *,iringomielia, atividade convulsiva recente *
<b>25–50 células/<math>\mu</math>l</b>	Traumatismo *, neoplasia, +/- vascular *, HD *, inflamatória
<b>&gt;50 células/<math>\mu</math>l</b>	Inflamatória (infecioso ou estéril), menos comumente HD *, traumatismo *

\* Pleocitoses devem se resolver 2-7 dias após o insulto.